

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



Obtención de Proteasas Microbianas

TESIS

Alberto Emilio Massucco

1981

Padrino de Tesis:

Prof. Dr. Antonio Pedro Balatti

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, fue realizado en la Cátedra de Procesos Bioquímicos Fundamentales de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

a mi esposa e hijo

a mis padres

Mi reconocimiento:

Al Dr. Antonio P. Balatti, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, al otorgarme sucesivas becas para poder completar estos estudios.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, al permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Mi agradecimiento:

A los Dres. Antonio P. Balatti y
Luis A. Mazza, por su guía y estímulo
permanente.

A todo el personal del CINDEFI por
la voluntad prestada en su asistencia
técnica.

INDICE

Introducción -----	1
Parte Experimental -----	9
Microorganismo -----	9
Materiales y Métodos -----	10
1. Medida de la concentración celular -----	10
2. Medida de pH -----	10
3. Medida de la velocidad de absorción de oxígeno -----	10
4. Medida de la actividad proteolítica -----	11
5. Medida de la concentración de lactosa -----	13
6. Producción específica -----	16
7. Productividad -----	16
8. Medios de cultivo -----	16
Esterilización -----	18
Conservación de cepa -----	18
Inóculos -----	19
Equipos -----	21
Resultados -----	25
Experiencias en erlenmeyers -----	25
Influencia de la naturaleza de la fuente de nitrógeno -----	25
Efectos de diferentes concentraciones de caseína sobre la producción enzimática -----	27
Influencia del agregado de tensioactivos sobre la obtención de proteasas alcalinas -----	30
Influencia de la concentración del ión calcio sobre la producción de proteasa alcalina -----	35
Influencia de la concentración de EDTA sobre la producción enzimática -----	37
Influencia de las condiciones de operación sobre la producción de proteasas alcalinas -----	39
Efecto de la temperatura -----	40
Influencia de la cantidad de inóculo -----	42
Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno -----	45

Estudios con inóculos congelados -----	48
Gráfica de un proceso típico -----	50
Estudios realizados en fermentadores con agitación mecánica -----	52
Estudios de obtención de proteasas alcalinas en un fermentador con circulación de líquido por inyección de aire -----	57
Curvas de evolución de los parámetros de fermentación de procesos típicos en reactores en escala de laboratorio -----	63
Discusión -----	66
Conclusiones -----	69
Bibliografía -----	71

INTRODUCCION:

La producción de proteasas extracelulares por microorganismos es conocida desde hace tiempo; y en un principio, esa capacidad fue utilizada como un método de identificación de especies microbianas⁽²⁾. Para la aplicación industrial de proteasas se recurrió inicialmente a preparados enzimáticos, en su mayoría provenientes de tejidos animales y vegetales⁽⁵⁾. El gran incremento en la demanda de estas enzimas se produjo a partir del año 1960 como consecuencia de su aplicación como aditivo en los detergentes utilizados a nivel industrial y doméstico. El éxito logrado por la incorporación de enzimas a detergentes se alcanzó cuando se encontraron enzimas microbianas, fundamentalmente las producidas por bacterias del género *Bacillus*⁽⁹⁾, que reunían ciertas propiedades como gran estabilidad en el rango de pH y temperatura de aplicación de dichos preparados y elevada actividad en presencia de los componentes de los detergentes, algunos de los cuales presentan una marcada inhibición sobre ciertas proteasas. Es importante también considerar la efectividad y capacidad para eliminar manchas a bajas concentraciones, y la posibilidad de tener bajos costos de producción con respecto a los métodos clásicos de obtención a partir de células animales y vegetales.

La gran demanda comercial de estas enzimas condujo a un rápido desarrollo sobre todo de la producción en gran escala, este incentivo tuvo una rápida respuesta en los estudios realizados sobre los diferentes aspectos biotecnológicos que hacen a la producción de estas enzimas como lo demuestran los numerosos trabajos aparecidos después de 1960. Si bien la bibliografía es muy abundante en lo que se refiere a métodos de aislamiento, selección de cepas productoras, y estudios de las propiedades de las diferentes enzimas producidas por microorganismos^(16,11,19,14,12), no se encuentra mucha información sobre la composición de medios de cultivo y las condiciones tecnológicas de proceso de obtención de dichas enzimas.

En base a las consideraciones anteriores se programaron estudios sobre la influencia de los nutrientes del medio de cultivo y variables de operación sobre la producción enzimática, con el fin de establecer las condiciones de optimización de proceso.

El trabajo tiene por fin además, colaborar al desarrollo de la industria en nuestro país para la producción de proteasas que presentan un amplio espectro de aplicación y de utilización.

Antes de considerar los estudios realizados donde se consig- nan los resultados obtenidos, se hará referencia a las principa- les propiedades de estas enzimas y sus principales aplicaciones, considerando especialmente los tipos de enzima y los microorga- nismos que la producen.

Las proteasas microbianas, según el pH óptimo para su acti- vidad pueden dividirse en tres grupos ⁽¹⁸⁾, a saber: proteasas ácidas, proteasas neutras y proteasas alcalinas. Con respecto a las proteasas alcalinas, que son objeto de este trabajo, pode- mos decir que dichas enzimas están ampliamente distribuidas entre hongos y bacterias ^(9,19,18) y presentan características simila- res a las enzimas tripsina y quimiotripsina ⁽¹⁴⁾. Dentro de este grupo, las enzimas más estudiadas corresponden a las denominadas subtilisinas, por ser producidas fundamentalmente por una diver- sidad de cepas de *Bacillus subtilis* y especies relacionadas.

La nomenclatura de estas enzimas ha sido modificada en varias oportunidades, lo cual ha causado no poca confusión.

Si tenemos en cuenta la nomenclatura propuesta por la Comi- sión de Enzimas, las proteasas alcalinas pertenecen a la categoría E.C.-3.4.4.16, con el nombre de fantasía de subtilo peptidasa A.

Por otro lado, la nomenclatura propuesta por E.L.Smith para este grupo de enzimas denomina subtilisina Carlsberg a la primera subtilisina aislada; a la enzima descrita por Hagihara, la deno- mina subtilisina BPN, y a la enzima aislada por la compañía NOVO, subtilisina Novo ⁽³²⁾.

Keay y Moser ⁽¹⁷⁾ purificaron algunas proteasas producidas por diferentes especies de bacilos y las clasificaron según su compo- sición aminoacídica, actividad enzimática, pH óptimo de actividad y propiedades inmunológicas. Ellos encuentran sólo dos tipos de proteasas alcalinas a las cuales denominan bacilopeptidasas A y B. La bacilopeptidasa A o subtilisina A incluye a la subtilisina Carlsberg y a las proteasas alcalinas producidas por *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*. Las bacilopeptidasas B o subti- lisina B incluyen a la subtilisina Novo y proteasas alcalinas del

Bacillus subtilis N.R.R.L. 3411, entre otros.

Una diferencia interesante que presentan los microorganismos productores de estas proteasas alcalinas, es que las especies de *Bacillus subtilis* que producen bacilopeptidasa A no producen proteasas neutras y amilasaas en cantidades apreciables. En cambio, las especies productoras de bacilopeptidasa B también producen una proteasa neutra y una amilasa⁽⁹⁾. Las proteasas neutras son metaloenzimas y aparentemente no están relacionadas con las bacilopeptidasas.

Las dificultades que presenta la eliminación de impurezas peptídicas ha complicado la determinación de las constantes físico-químicas de estas enzimas. No obstante, los valores de sedimentación, difusión y viscosidad muestran que las subtilisinas son moléculas compactas. Recientes estudios cristalográficos con rayos X confirman que la molécula es casi esférica, con un diámetro de aproximadamente 42 Å. El centro activo de estas proteasas es el residuo serina 221 localizado en la superficie de la enzima. Su HO^- se encuentra en una posición tal que posibilita la formación de la unión hidrógeno con el resto histidina ubicado en la posición 64. Esta disposición es similar a la que presenta la proteasa pancreática.

Estas enzimas no son estables a todos los valores de pH, aunque soluciones conteniendo entre el 10 y 20 % de péptidos autolizados pueden mantener la actividad durante muchas horas a pH neutro y baja temperatura. A pH bajos (1-2) las subtilisinas son desnaturalizadas. A valores altos de pH (por encima de 11), tiene lugar una desestabilización de la estructura de las subtilisinas.

La desnaturalización por efecto del calor es muy rápida por encima de 55°C. El complejo enzima-DFP (diisopropilfluorofosfato) es más estable que la enzima sola, lo cual indicaría que la autodigestión juega un papel importante en el límite de estabilidad de esta enzima, el ión Ca^{2+} muestra un efecto estabilizante sobre estas enzimas, especialmente a valores de temperatura entre 50-60°C. Las subtilisinas son relativamente resistentes a la desnaturalización por urea y guanidina en solución.

Las subtilisinas no necesitan de cofactores para manifestar

su actividad. Tanto la subtilisina Carlsberg como la BPN-Novo son inhibidas por DFP a menos del 1% de su actividad original, debido a la reacción con el residuo serina ubicado en el sitio activo⁽¹⁸⁾.

Tanto el indol como el fenol y el hidrosinamato actúan como inhibidores competitivos de las subtilisinas. Otros inhibidores son: acetona, acetonitrilo, ciclohexanona, ciclohexanol y alcoholes alifáticos.

Especificidad: las subtilisinas pueden hidrolizar tanto las uniones peptídicas como la unión éster y resultan también efectivas en reacciones de transesterificación y transpeptidación.

Actividad estearásica: la subtilisina Carlsberg es capaz de hidrolizar ésteres metílicos de ácidos carboxílicos alifáticos simples, también ambas subtilisinas hidrolizan la tripropionina, tributirina, triacetina, etc..

Acción peptidásica: la cadena oxidada de la insulina (cadena B) es atacada en una diversidad de uniones por las subtilisinas cuando se les permite actuar durante un largo tiempo⁽¹⁸⁾. No obstante, puede comprobarse que la unión leu₁₅-tyr₁₆ es escindida mucho más rápidamente que cualquier otra unión. Este efecto es común para ambas subtilisinas. La gran susceptibilidad de esta unión a la hidrólisis por las subtilisinas es debida a la secuencia de residuos aminoácidos contiguos a la unión. Se considera que estos residuos de la cadena B de insulina se unen a los sitios secundarios de unión de la enzima.

PH óptimo: cuando se utiliza como sustrato ésteres sintéticos, la actividad de las subtilisinas aumenta con el pH. El pH óptimo de las enzimas hacia sustratos proteicos depende de una serie de factores.

El pH óptimo se encuentra entre 10 - 11 cuando se utiliza caseína como sustrato, mientras que para la subtilisina Novo el pH óptimo se encuentra alrededor de 10.

En la siguiente tabla se consignan las principales características de las proteasas microbianas.

Propiedades de las Proteasas

	Producidas por:	pH		Metaloenzima	P.M.	Inhibic.		Actividad esteárica
		Max. act.	Max. est.			DFP	EDTA	
Proteasas ácidas	Principalmente hongos	2-5	2-6	no	35.000	no	no	escasa
Proteasas neutras	Bacterias y hongos	7-8	7-9	sí	45.000	no	sí	no
Proteasas alcalinas	Bacterias y hongos	9-11	5-10	no	15.000 30.000	sí	no	muy alta

Aplicaciones:

Entre las principales aplicaciones de estas enzimas podemos citar a la industria de los detergentes ⁽¹⁸⁾, como ya ha sido señalado, la expansión espectacular de esta industria tiene su origen en la producción comercial de enzimas microbianas, cuyas propiedades, fundamentalmente estabilidad y actividad en medios alcalinos, posibilitaron su incorporación a los distintos preparados detergentes. La aceptación de estos preparados enzimáticos fue sumamente rápida. Así en 1964 las ventas de estos productos correspondían al 10% del mercado de detergente, y en el año 1970 sobrepasó el 50% de las ventas totales. Las estimaciones actuales consideran que el mercado para estos polvos detergentes está en franca expansión ⁽⁹⁾.

Las enzimas utilizadas durante los últimos 10 años han sido casi totalmente subtilisinas producidas por cepas seleccionadas de *Bacillus licheniformis*. y *Bacillus subtilis*.

Otra aplicación de estos preparados enzimáticos fundamentalmente importante para nuestro país, es en la industria del curtido de pieles ^(25,31,9,18). La industria curtidora es en la actualidad una de las más contaminantes de los recursos naturales, principalmente de los hídricos. Por otra parte, la mayoría de los establecimientos curtidores en nuestro país se encuentran en el área

metropolitana, que por otro lado es la más densamente poblada, y sometida a una elevada polución. En dicha zona existen más de 200 establecimientos registrados dedicados al curtido de pieles por el proceso al cromo, la mayoría de éstos vuelcan directamente sus líquidos residuales a los cauces de agua de esta zona y el resto los descarga en el Río de la Plata a través de sus colectores. Todos los cursos de agua próximos a los establecimientos presentan un alto grado de polución. La carga orgánica de un desagüe de curtiembre varía entre 55 y 115 Kg. de DBO_5 por tonelada de piel curtida, lo cual equivale al desagüe de una población compuesta por 1000 a 4000 habitantes (la carga de un líquido cloacal es de 54 g de DBO_5 por habitante por día). Resulta evidente que esta actividad produce una elevada contaminación en los cursos de agua. Una posible solución o atenuación de este problema, consiste en reemplazar el actual sistema de depilado con $S^{=}$ por preparados enzimáticos (proteasas alcalinas) que permiten eliminar por ese lado, el uso de $S^{=}$ que de por sí constituye un contaminante muy peligroso, y buena parte de la materia orgánica arrastrada por los efluentes, ya que utilizando el depilado enzimático el pelo puede ser recuperado entero y posteriormente comercializado ⁽¹⁵⁾; otra aplicación de estas enzimas es en la industria de la panificación, donde las proteasas de Bacillus son usadas en la manufactura de bizcochos para proveer harina con un contenido suficientemente bajo de proteína, y así hacer la masa más trabajable, menos elástica, y proporcionar también uniformidad y mejoramiento de aroma y sabor ^(1,9). La cantidad de enzima requerida es pequeña y depende de la cantidad y calidad de proteína en la harina.

La industria de la cerveza utiliza estas enzimas ocasionalmente en la fabricación de azúcares de malta de tipo de reemplazo, pues a veces es necesario agregar una proteasa para conseguir la suficiente degradación de proteína. El mismo agregado puede ser necesario en el "mashing" convencional si se usa un gran porcentaje de aditamento y bajo nivel de malta. Nuevamente las proteasas de origen bacilar han sido halladas adecuadas para esta aplicación. La concentración de enzimas requerida depende de una variedad de factores. También se utilizan estas enzimas para prevenir

el desarrollo de opalescencia en cervezas ligeras, agregándolas durante las operaciones finales de su manufactura evitando de esta manera el "Chillproof" ^(1,9) de estas bebidas. Las enzimas bacterianas tienen gran aplicación en estos procesos y desarrollos tecnológicos ulteriores podrían acrecentar considerablemente su demanda.

En la industria del pescado ⁽⁹⁾ las proteasas de *Bacillus* son usadas para la obtención de harina, aceite y solubles. El residuo sólido era secado para producir harina y la parte acuosa, que tiene un alto contenido de vitaminas y proteínas se evaporaba a 50% de sólidos y se vendía como soluble de pescados, alternativamente se secaba en tambores rotatorios o por spray.

La viscosidad de la fracción acuosa se acrecienta durante la evaporación y tiene tendencia a tornarse gelatinosa. El tratamiento previo con proteasa bacteriana supera ambos problemas y acrecienta la efectividad de la evaporación ^(22,23). El tratamiento con proteasa es de particular importancia si el producto debe ser secado.

Se puede citar también otros usos tales como su utilización para la remoción de plaquetas dentarias causadas por la inclusión de microorganismos bucales en un material orgánico formado por dextranos y proteínas. Se ha demostrado que la administración de una mezcla de proteasas y amilasa de *Bacillus subtilis* en forma de enjuague bucal, reduce un 50% la formación de plaquetas dentarias en seres humanos ^(8,18,36). Las materias primas básicas para la producción de grasa animal ⁽³⁴⁾ poseen considerable cantidad de proteínas, la recuperación de las cuales es importante para la economía del proceso. La materia prima es calentada bajo presión a altas temperaturas y la grasa y proteínas se separan. Este proceso produce considerable desnaturalización de las proteínas perdiéndose de esta forma parte de su valor nutritivo. El uso de proteasas bacterianas, y el operar a bajas temperaturas, produce una considerable mejora en la calidad del material proteico recuperado.

Otras aplicaciones existentes o potenciales de las proteasas microbianas, incluyen la recuperación de plata de las películas

y papeles fotográficos por digestión de la capa gelatinosa de la emulsión, quitado de manchas en la limpieza en seco de la ropa, tiernización de la carne, modificación de proteínas en cereales para alimentar infantes, como coadyuvante digestivo, como alivio de inflamaciones, golpes y magullones, etc..

La expansión en muchos de estos casos depende de los desarrollos tecnológicos que permitan acrecentar y abaratar los costos de producción de estas enzimas, mejoramiento de los métodos de purificación y el uso de técnicas de inmovilización satisfactorias (18).

PARTE EXPERIMENTAL

MICROORGANISMO:

Se empleó para todas las experiencias una cepa de *Bacillus subtilis* NRRL 3411. Pues si bien la capacidad de producción de proteasas alcalinas está extensamente distribuída entre microorganismos de diferentes especies, la FAO y la Food and Drug Administration restringen la producción industrial de estas enzimas a *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* por su demostrada inocuidad sobre seres humanos. Esta cepa de acuerdo a su clasificación según el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight Edition (1964), presenta las siguientes características:

Familia: Bacillaceae

Orden: Eubacteriae

Clase: Esquisomicetes

Especie: *Bacillus subtilis*

Cepa: NRRL 3411

Características: Bacilos raramente en cadena; color uniforme con flagelos laterales, endosporos de 0,8 por 1,5 a 1,8 μm ; con la superficie del esporo libreteñida tenuemente. En su germinación, el saco del esporo se rompe ecuatorialmente. Después de emerger la célula vegetativa, la lisis del saco del esporo es claramente lenta.

Las colonias en medios agarizados son redondas o irregulares de superficie mate, transformables en gruesas y opacas, pueden ser rugosas y pueden transformarse en color crema o marrón. Las características de las colonias varían grandemente con la composición del medio. El desarrollo crecido sobre agar no se dispersa realmente en los medios líquidos.

El crecimiento en superficie en medios agarizados conteniendo 1% de glucosa da colonias gruesas, frecuentemente rugosas y marrones. Puede formarse un disco rojizo bajo el crecimiento.

MATERIALES Y METODOS:

1.- Medidas de la concentración celular.

a. Técnica turbidimétrica:

La densidad óptica de las suspensiones celulares fue medida utilizando un espectro fotocolorímetro Bausch y Lomb modelo "Spectronic 20" a 660 nm, utilizando agua destilada como diluyente.

b. Técnica gravimétrica:

El peso seco de los desarrollos obtenidos en medio líquido fue medido sobre una alícuota de 10 ml de cultivo que se centrifugó a 9.000 g durante 20 min. y se lavó 2 veces con agua, y finalmente se secó en estufa a 100-105°C durante 24 horas.

2.- Medida de pH:

El pH de los desarrollos en medio líquido fue medido sobre una alícuota de los caldos utilizando un peachímetro Seibold.

3.- Medida de la velocidad de absorción de O_2 (VAO):

El valor del VAO en los erlenmeyers agitados y en fermentadores fue evaluado en base al método propuesto por Cooper⁽⁴⁾. El método consiste en medir la velocidad de oxidación de una solución de Na_2SO_3 por reacción con el O_2 disuelto empleado en la aeración. Se utiliza una solución de Na_2SO_3 0,5 a 0,8 N en presencia de $CuSO_4$ 10^{-3} M como catalizador, bajo estas condiciones la velocidad de oxidación del Na_2SO_3 es mucho mayor que la velocidad de disolución de O_2 , e independiente de la concentración de sulfito por encima de 0,015 M. La solución de sulfito junto con el catalizador se colocan en el equipo a evaluar, se agita y aerea sacando en forma periódica muestras en las cuales se evalúa el sulfito remanente por iodometría. La concentración de O_2 disuelto es prácticamente cero y la velocidad de absorción de O_2 está dada por $\frac{dc}{d\theta} = K_L a \cdot C$, donde $K_L a$ es el coeficiente volumétrico total de transferencia de O_2 en unidades de fase líquida por unidad de diferencia de concentración (h^{-1}), C = concentración de saturación de O_2 en las condiciones del ensayo en medio líquido.

4.- Medida de la actividad proteolítica:

La actividad proteolítica fue determinada mediante una modificación del método de Anson según Keay y Wildi⁽¹⁵⁾, sobre una alícuota de caldos fermentados libre de células. La unidad de actividad proteolítica Anson modificada (uAPAM/ml) se define como la cantidad de enzima capaz de producir sobre un sustrato al 1% de caseína fragmentos solubles en ácido tricloroacético 0,2 M, equivalentes a 0,5 µg de tirosina a 37°C y en 10 minutos de reacción.

Reactivos:

Preparación del sustrato de caseína:

Se colocan 2 g de caseína tipo Harnsten en un vaso de precipitado de 100 ml y se añaden 20 ml de NaOH 1 N, se agita con varilla de vidrio contra las paredes hasta formar una pasta uniforme (no se debe calentar), se adiciona 50 ml de H₂O destilada, se disuelve totalmente la pasta y se ajusta el pH con H₃PO₄ 1:4 hasta el valor deseado, que en este caso es 10, se coloca el preparado en matraz aforado, de 100 ml y se lleva a volumen con H₂O destilada. Esta solución debe conservarse en heladera a 4°C por no más de 72 horas.

Otros reactivos:

Solución de ácido tricloroacético 0,4 M (TCA)

Solución de CO₃Na₂ 0,4 M (CO₃Na₂)

Reactivo de Folin Cicalteau, dilución 1:2 con H₂O (FF)

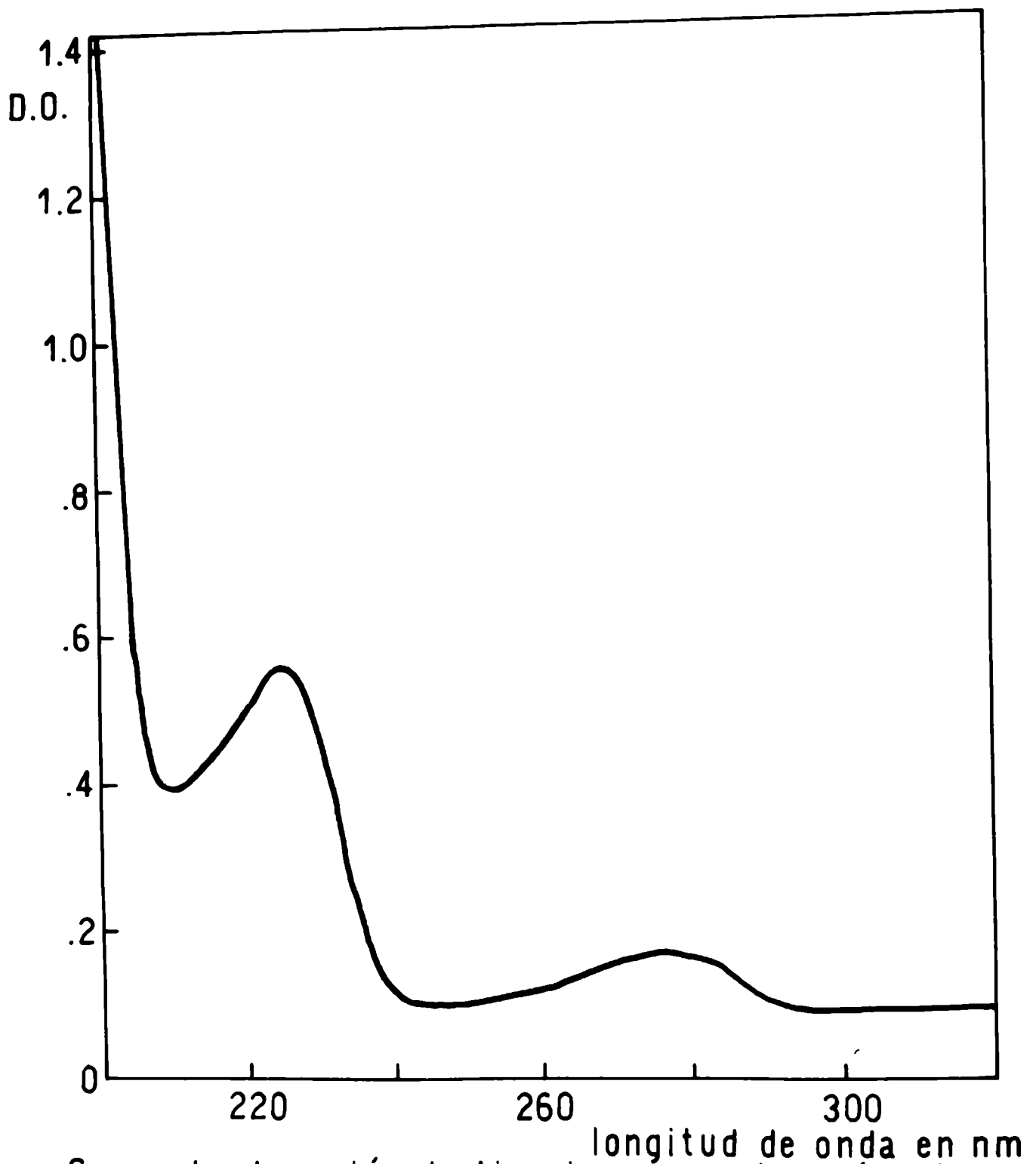
Solución patrón de tirosina.

Preparación de la muestra:

La muestra a evaluar está constituida por una alícuota de los caldos de fermentación libre de células, y debe diluirse con una solución 0,01% de acetato de calcio, de tal manera de obtener alrededor de 200 unidades de actividad proteolítica Anson modificada en la mezcla de reacción.

Técnica:

Se termostatan todos los reactivos en baño de agua a 37°C durante 5 min. en los tubos de reacción se colocan 1 ml de muestra y 1 ml de sustrato de caseína, al cabo de 10 min. se detiene la reacción con 2 ml de TCA dejando reposar el precipitado por espacio



Curva de absorción de tirosina concentración $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ en HCl 0.2 N, en un espectrofotómetro Beckman 25 U.V./Vis.

Figura 1

de 20 min., luego se separa el precipitado ya sea por filtración o centrifugación.

a) Sobre una alícuota de 1 ml del sobrenadante se agrega 1 ml de F.F. y 5 ml de CO_3Na_2 , se incuba 20 min. a 37°C y se lee la absorbancia a 660 nm.

b) Directamente se lee la absorbancia del sobrenadante a 275 nm (Fig. 2). En todos los casos para asegurar la homogeneidad de las mezclas de reacción se utiliza un agitador tipo vortex.

5.- Medida de concentración de lactosa:

Para esta medida se utilizó el método de Hultman modificado por Hyvarinen y Nikkila⁽¹³⁾ sobre una alícuota de los caldos fermentados libre de células.

Reactivos:

3 l de CH_3COOH glacial

4,5 g de Tiourea

180 ml de 0-Toluidina

Preparación de los reactivos:

Disolver en 500 ml de CH_3COOH glacial 4,5 g de tiourea hasta que no queden cristales (disolución completa). Cuando la tiourea esté totalmente disuelta, se añaden los 180 ml de 0-Toluidina y se completa a 3 l con acético glacial. Se guarda en frasco color caramelo en oscuridad y se usa después de dos días de preparado.

Técnica:

A 5 ml de la solución de 0-Toluidina se agregan 20 μl de muestra y se coloca a baño maría a ebullición durante 5 min.. Se enfría y se lee su absorbancia a 625 nm. Junto con los tubos problema se procesan tubos testigo y un blanco de reactivos.

Preparación de los testigos.

Solución madre:

Solución de lactosa al 5% en ácido benzoico. Guardar en heladera. De esta solución se pueden hacer los testigos (fig. 3).

1 ml de solución "madre"-----	50 ml (1 g/l)
2 ml de solución "madre"-----	50 ml (2 g/l)
4 ml de solución "madre"-----	50 ml (4 g/l)
6 ml de solución "madre"-----	50 ml (6 g/l)

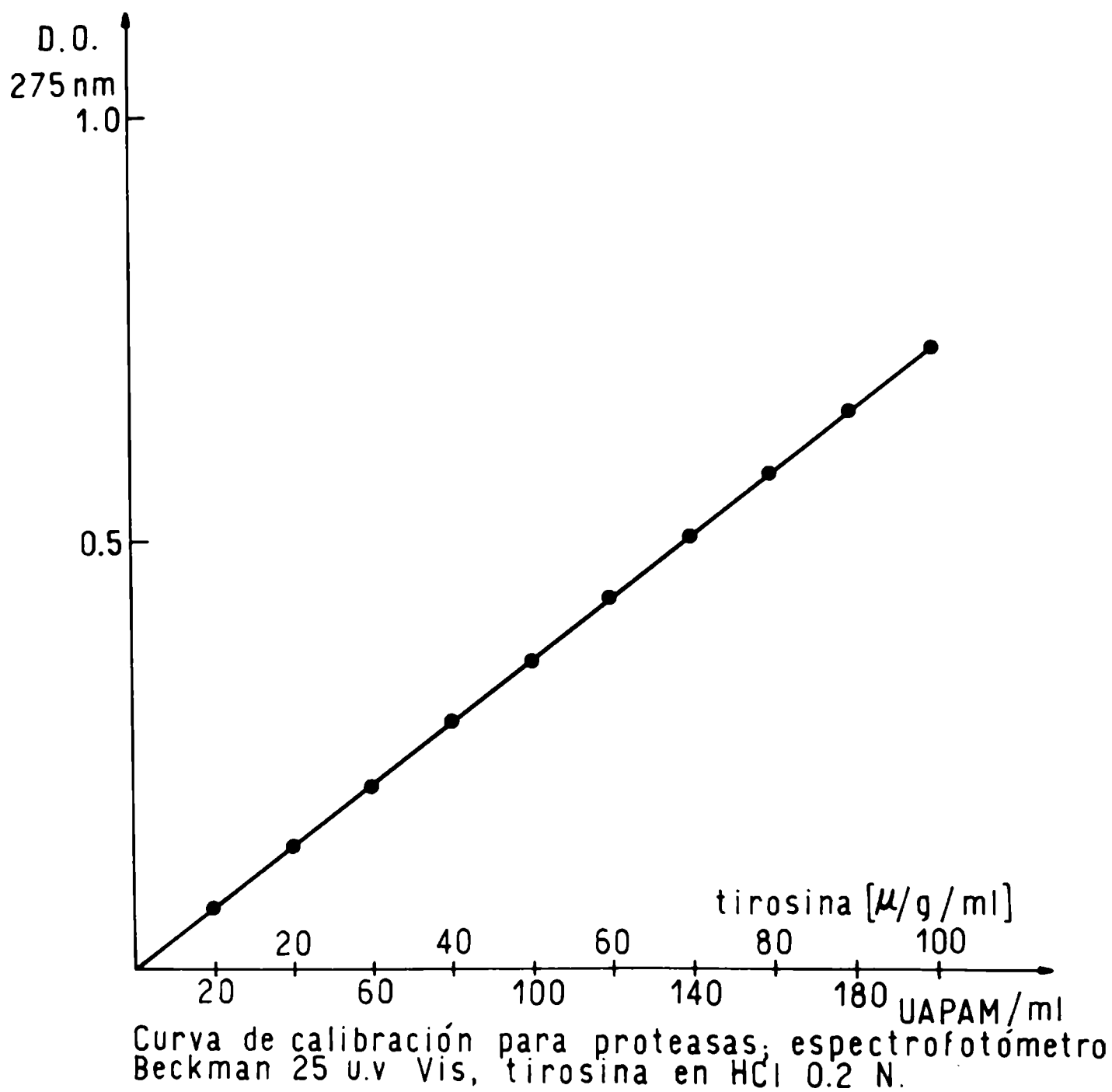
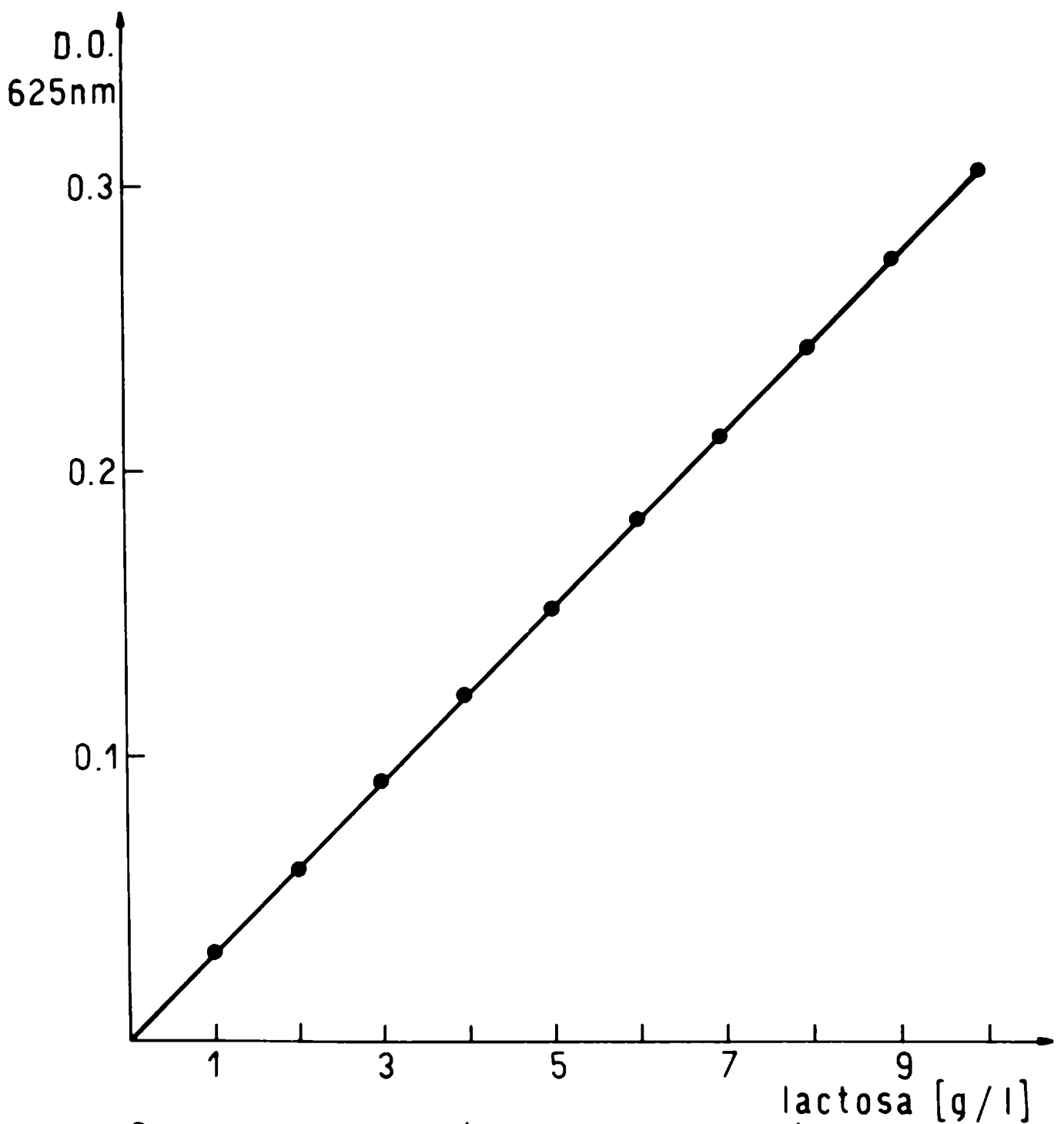


Figura 2



Curva de calibración de determinación de lactosa por el método de O-toluidina. Espectrofotómetro Spectronic 20.

Figura 3

8 ml de solución "madre" ----- 50 ml (8 g/l)
10 ml de solución "madre" ----- 50 ml (10 g/l)

Estas soluciones tienen que prepararse con solución de ácido benzoico saturada - que sirve como conservador.

Para las soluciones problema se usa H₂O destilada.

6.- Producción específica:

La producción específica fue calculada, dividiendo el valor de actividad enzimática volumétrica, ya sea por el peso seco o la densidad óptica de la muestra obtenida en cada caso.

7.- Productividad:

La productividad se calculó dividiendo la concentración enzimática de los caldos fermentados por el tiempo en horas correspondiente, a la muestra en cuestión.

8.- Medios de cultivo:

Para repicar la cepa se empleó el Medio N°1 que contiene:

Peptona MC 2 -----	5 g
Extracto de levadura en polvo -----	5 g
Glucosa -----	1 g
Agar -----	20 g
H ₂ O -----	csp 1000 ml

TABLA I

CARACTERIZACION DE LAS FUENTES DE NITROGENO EMPLEADAS

Peptona	N. Total %	N - NH ₂ %	Tipo
MC 2	14,40	5,17	Hidrolizado pepsínico de hígado de cerdo.
MC 3	13	6,5	Hidrolizado pancreático de caseína.
MC 4	13	6,5	Hidrolizado pancreático de caseína desprovista de fosfatos.
MC 7	13	7,5	Hidrolizado pancreático de caseína.
MC 8	14	5,5	Hidrolizado pepsínico de estómago de cerdo.
Biochem	13	7,5	Hidrolizado pancreático de carne.
Bactopeptona DIFCO	14,12	4,17	Hidrolizado tríptico de carne.
Caseína	16	-	

Para el desarrollo del microorganismo en medio líquido se iniciaron los estudios utilizando el medio N°2 (medio base)⁽³⁵⁾, donde se hicieron modificaciones en cuanto a la naturaleza y concentración de la fuente nitrogenada, concentración de Ca^{2+} , agregados de tensioactivos y EDTA. La composición de este medio era en g/l:

Lactosa -----	20
Peptona MC 2 -----	10
NaCl -----	1,5
Mg $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,15
Ca $\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -----	0,06
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ -----	1,5
PO_4HK_2 -----	1,5
Na_2SO_4 -----	1,5
Mn $\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -----	0,01

En ambos casos el pH fue ajustado a 7,2 antes de esterilizar.

Esterilización:

Todos los materiales y medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave con vapor saturado de 121°C durante 15 min.. En general, se procedió a esterilizar en forma separada la fuente de nitrógeno y fosfatos de la fuente de carbono.

Conservación de la cepa:

El microorganismo fue conservado bajo dos formas: por liofilización para períodos largos de tiempo, y sobre agar recto (medio N°1) bajo capa de vaselina estéril, en heladera a 4°C por espacio de no más de un mes.

Liofilización:

Equipo utilizado:

Consta de una bomba para alto vacío (max 10^{-4} mm Hg) de tipo mecánico, doble rotor, de funcionamiento en operación continua, alta capacidad de bombeo, marca "Precision Scientific Co." (modelo 500 Chicago, USA); la misma se conecta a una trampa de condensado, sumergida en un vaso Dewar con aire líquido, y por su intermedio a un colector de cuatro entradas cada una de las cuales lleva acoplados sendos tubos ramificados que permiten la conexión de cuatro tubos para liofilizar cada una. A su vez todo

el sistema va conectado a un vacuómetro portátil marca "FIC" (Industria Argentina). El equipo es compacto y sencillo permitiendo series de 16 liofilizados por operación (ver esquema Fig. 4). Todas las conexiones del equipo se realizaron con tuberías de caucho de silicona para alto vacío de 6 mm. de diámetro interno. Los tubos para liofilización son de vidrio neutro de 100 mm de longitud por 7 mm de diámetro externo y 1 mm de pared.

Técnica:

Se suspende sobre 5 ml de suero equino estéril el desarrollo de un tubo de agar inclinado (sobre medio N°1 con 24 a 48 horas de desarrollo en estufa a 30°C) y se lo fracciona en alícuotas de 0,06 ml con pipeta Pasteur en los tubos de liofilización.

Estos, luego se conectan a los tubos ramificados en forma aséptica y se congelan en baño de alcohol hielo seco (-40°C) durante 20 min.. Luego, se conectan al colector del equipo, se enciende la bomba de vacío, dando así comienzo a la operación de liofilización con un vacío de aproximadamente 0,1 mm de Hg. Este proceso se da por concluído cuando las muestras se despegan fácilmente de los tubos de liofilización, y han adquirido temperatura ambiente (aprox. 6 horas). Sin interrumpir el vacío del sistema se cierran y cortan los tubos de liofilización a la llama de un soplete de metano/O₂; una vez terminada esta operación se prueban los tubos cerrados uno a uno con un téster de vacío, siendo aptos sólo aquellos en los cuales se manifiesta una fosforescencia similar a la del equipo debida al vacío de su interior.

Inóculos:

Los ensayos se iniciaron a partir de la cepa liofilizada, la cual se repicó en el medio N°1 que se mantuvo bajo capa de vaselina estéril, a partir de estos desarrollos se hicieron repiques en tubos con medio de cultivo N°1 y después de mantenerlos a 30°C durante 24 horas se transfirió el desarrollo de un tubo a los erlenmeyers conteniendo el medio N°2 o algunas de sus modificaciones. La concentración inicial de siembra en todos los casos fue similar, aproximadamente 0,15 UDO.

ESQUEMA DE EQUIPO PARA LIOFILIZAR

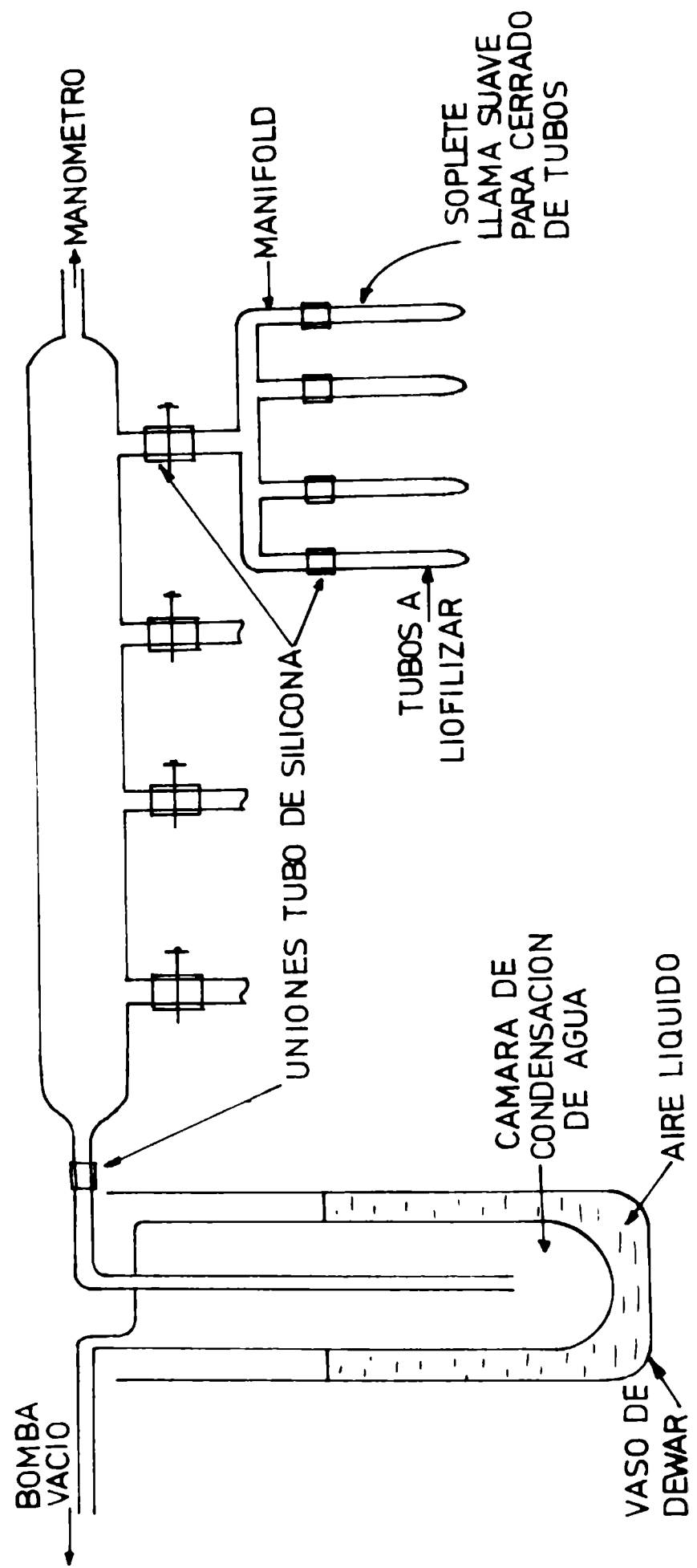


Figura 4

Equipos:

Las experiencias se llevaron a cabo en dos escalas de trabajo: 1.- Ensayos en frascos agitados

2.- Ensayos en fermentadores

1.- Los ensayos sobre composición del medio de cultivo se realizaron en frascos erlenmeyers lisos de 1000 ml de capacidad con 200 ml de medio de cultivo, es decir una relación volumétrica 1:5; estos frascos fueron colocados en un agitador rotatorio de 2,5 cm de excentricidad y una agitación de 250 rpm en cuarto estufa a 30°C. En todos los casos los ensayos se efectuaron por duplicado y siempre se confrontaron con un testigo en el cual se mantuvieron las condiciones iniciales en cuanto a medio de cultivo y variables de operación.

Cuando se estudió el efecto de la ~~VAO~~ en esta escala, se trabajó con distintos volúmenes de medio de cultivo, obteniéndose previamente para cada condición el valor de VAO correspondiente por el método de Cooper⁽⁴⁾.

2.- Las experiencias en fermentadores fueron llevadas a cabo en reactores con y sin agitación mecánica, donde se estudió la influencia de la aeración sobre la producción enzimática. Se utilizaron en esta escala dos tipos de equipos: a) Un equipo de fermentación convencional con agitación mecánica marca "New Brunswick" integrado por tres fermentadores de 7,5 l. de capacidad, y provistos de accesorios para el control de temperatura, velocidad de agitación, presión y caudal de aire. En todos los casos se emplearon 3 l de medio de cultivo, la relación entre la altura del líquido y el diámetro del fermentador fue de 1,2.

b) Una columna de fermentación no convencional con circulación de líquido por inyección de aire, construída en nuestro laboratorio⁽⁶⁾ de 3 l de capacidad útil, termostatzada en cuarto estufa y con accesorios para el control de caudal y presión de aire.

En las figuras N°5y6 se pueden observar los esquemas correspondientes a los equipos utilizados.

En los fermentadores con agitación mecánica se realizaron experiencias a 300, 400, 500 y 600 rpm empleando en todos los casos

un caudal de aire de 1 l/l.min..

Condiciones de operación en fermentadores:

1.- Aire:

El aire producido en un compresor, es esterilizado antes de su ingreso al fermentador por medio de un filtro que contiene lana de vidrio y prefiltro de algodón previamente esterilizado en autoclave con vapor saturado a 121°C durante 30 min. y secado a 100 - 105°C en estufa por 3 - 4 hs.

El regulador de presión de aire del equipo se ajustó a un valor de 10 libras/pulgada², y el caudal de aire se ajusta a las condiciones seleccionadas por medio de una válvula reguladora y medida en un flotámetro.

2.- Control de pH:

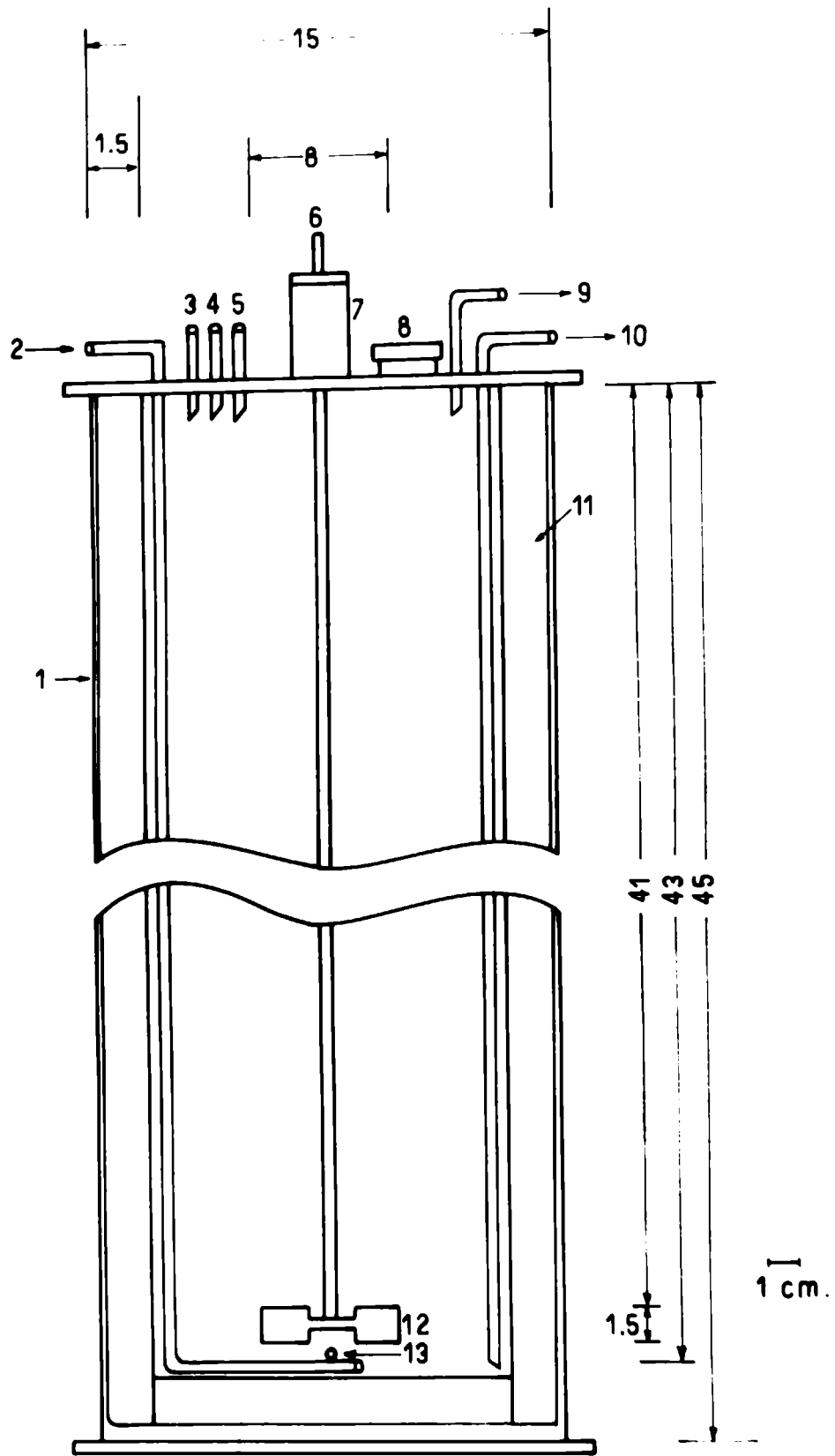
El medio de cultivo base lleva incorporadas soluciones de fosfatos que amortiguan las variaciones de pH durante el proceso, no obstante debido al desarrollo microbiano, el valor de pH del medio se va modificando con el curso de la fermentación. El pH inicial de los medios fue ajustado a 7,2.

3.- Control de espuma:

Fue efectuado en forma manual utilizando antiespumante a base de siliconas tipo SAG 471, marca Darmex, el cual fue ensayado previamente en cuanto a su capacidad inhibitoria de la síntesis enzimática, demostrando ser inocuo, diluído al 10% en agua destilada y esterilizado en autoclave con vapor saturado a 121°C durante 20 min.. La adición de antiespumante se hizo conforme a la formación de espuma, pasando por gravedad desde su reservorio hasta el tanque de fermentación al cual está conectado por medio de un tubo de caucho siliconado.

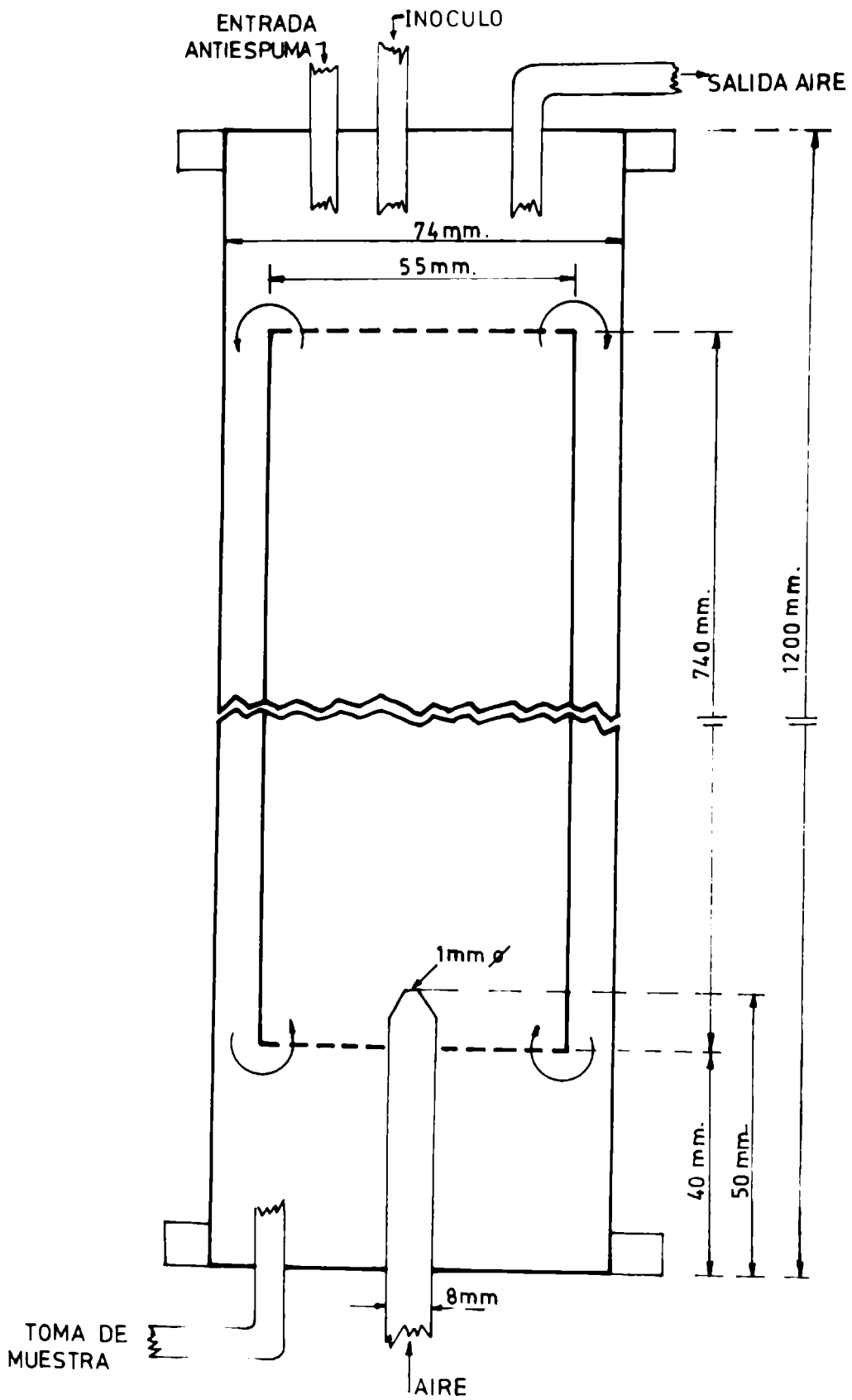
4.- Agitación:

El equipo convencional consta de un sistema de agitación constituido por 4 paletas planas unidas a un eje vertical que atraviesa al tanque por su tapa para unirse por medio de una transmisión elástica a un motor situado en su parte superior (Fig. 5). La velocidad de agitación se regula con un control electrónico que actúa sobre el motor, y se mide por medio de un taquímetro acoplado al equipo. En la columna, la agitación se produce por inyección de aire y se controla variando el caudal de entrada de este gas.



Esquema de un fermentador de tipo convencional con agitación mecánica.
 1: vaso; 2: entrada de aire; 3: antiespumante; 4: inóculo; 5: nutrientes;
 6: eje del agitador; 7: guarnición; 8: tapa; 9: salida de gases;
 10: salida de muestra; 11: corta corriente; 12: agitador; 13: burbujeador.

Figura 5



-FERMENTADOR SIN AGITACION MECANICA
 CON CIRCULACION DE LIQUIDO POR INYECCION
 DE AIRE.

Figura 6

RESULTADOS

EXPERIENCIAS EN ERLLENMEYERS

INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA FUENTE DE N₂.

En estas experiencias se utilizaron diferentes fuentes de N₂ tanto de origen nacional como importado. Se emplearon:

a) Peptonas: Bactopeptona Difco; peptona Biochem, y peptonas MC 2, MC 3, MC 4, MC 7 y MC 8. b) Caseína.

Todos los ensayos se realizaron empleando el medio N°2 y utilizando las fuentes de nitrógeno antes mencionadas en la concentración de 10 g/l. En la tabla 1 se indican algunas características de las sustancias ensayadas.

En la figura 7 donde se encuentran los resultados obtenidos en estos estudios se puede observar que los mayores valores de proteasa alcalina se obtienen en aquellos medios que contienen caseína. En lo que se refiere al crecimiento celular en general se observa que no existe una correspondencia con la producción de proteasas alcalinas. Es de destacar que empleando caseína se alcanza una producción que es mayor en un 10% en relación al proceso donde se utiliza el medio base que contiene como fuente de nitrógeno un hidrolizado pepsínico de hígado de cerdo (MC 2). Las peptonas MC 2, MC 3, MC 4, MC 7 y MC 8, fueron empleadas en razón de su disponibilidad en nuestro medio.

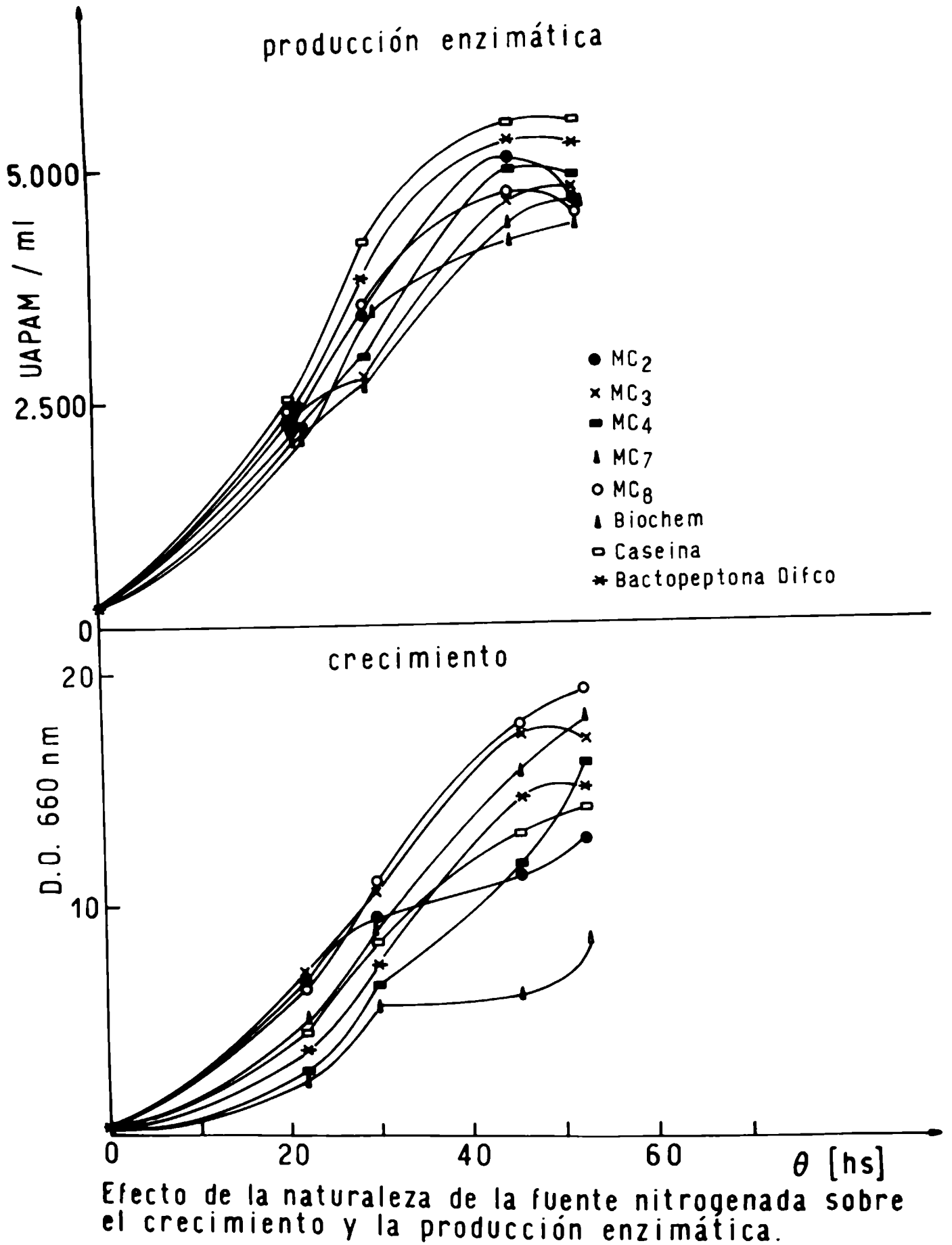


Figura 7

EFFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CASEINA SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA.

En razón de los resultados obtenidos en los estudios de la influencia de la naturaleza de la fuente nitrogenada sobre la producción enzimática, donde la caseína se comportó como la mejor fuente de nitrógeno, es que se programaron nuevas experiencias donde se varió la concentración de caseína desde 6 hasta 14 g/l. Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla II y la figura 8 donde se ve que para una concentración de caseína de 8 g/l se logran los mayores valores tanto en actividad volumétrica 6.000 uAPAM/ml como específica 895.000 uAPAM/g de proteasa alcalina; alcanzándose así un incremento del orden del 30% con respecto al testigo que contiene peptona MC 2 en concentración de 10 g/l.

En base a estos resultados se adoptó para los ensayos posteriores como fuente de nitrógeno caseína pura en la concentración de 8 g/l.

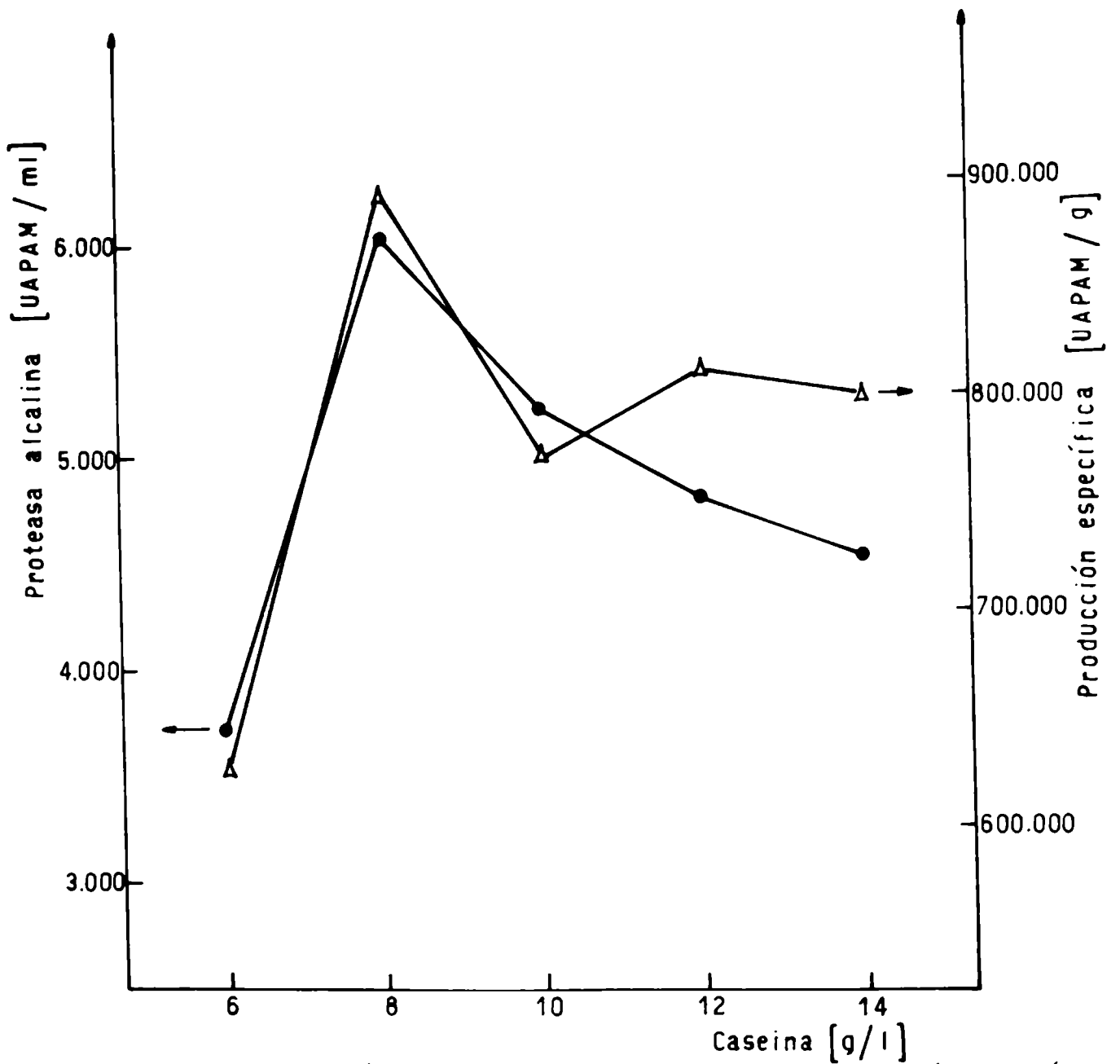
TABLA I I

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE CASEINA SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA

Caseína (g/l)	Peso seco (g/l)	Activ. Enzimática (uAPAM/ml)	Prod. Esp. (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Hora de proceso (h)
6	5,87	3.700	630	60
8	6,70	6.000	895	60
10	6,75	5.200	770	60
12	5,78	4.800	830	60
14	5,62	4.500	800	60
Testigo	6,90	4.700	681	60

Medio de cultivo utilizado (g/l):

Lactosa 20; Caseína variable según tabla; NaCl 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06;
 KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01.



Efecto de la concentración de caseina sobre la máxima producción enzimática.

Figura 8

INFLUENCIA DEL AGREGADO DE TENSIOACTIVOS SOBRE LA OBTENCION DE PROTEASAS ALCALINAS.

En razón de los resultados obtenidos por otros autores (33,37) donde se indica la acción estimulante sobre la producción enzimática del agregado de tensioactivos al medio de cultivo, se programaron una serie de experiencias donde se estudió la influencia de distintos agentes tales como: oleato de sodio, tritón X-100 (Eter mono (P-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenílico) del Propilenglicol), Tween 80 (Polioxietilensorbitanomonooleato) y dodecilsulfato de sodio (SDS).

En una primera etapa se hicieron experiencias orientativas utilizando los tensioactivos antes mencionados en concentraciones de 0,05 y 0,1 % con el fin de determinar su efecto sobre la producción de la enzima.

En la tabla III se puede observar el efecto favorable del Tween 80 y del oleato de sodio; como así también el efecto inhibitor del Tritón X-100 y del SDS. El incremento observado es de aproximadamente 40% y 13% con respecto a los procesos donde se emplea el medio testigo y el medio modificado en su fuente de nitrógeno sin tensioactivos. Posteriormente se hicieron una serie de ensayos donde se comparó la producción de la enzima, adicionando los tensioactivos en un caso al comienzo del proceso y en otro a las 20 horas de iniciado. El agregado de tensioactivo a las 20 horas de proceso no produjo ningún efecto favorable, por lo tanto en todos los ensayos posteriores el agregado de tensioactivos fue realizado al iniciar el proceso.

En función de los resultados anteriores donde se ensayaron solamente dos concentraciones de productos y debido al efecto favorable del agregado de los mismos se realizaron nuevas experiencias donde se ensayaron los tensioactivos más efectivos en un rango más amplio de concentración.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IV y Fig. 9 donde se puede observar que los más altos valores de actividad enzimática volumétrica de proteasa alcalina, 11.100 uAPAM/ml, se obtienen en procesos donde se utiliza Tween 80 en concentración 0,5 %.

El valor de actividad alcanzado es superior en un 130% con respecto al testigo. En la tabla también se observa que a medida que aumenta la concentración de tensioactivo, si bien se produce un aumento de la actividad enzimática los valores de crecimiento tienden a descender.

Es de destacar que para una concentración de Tween 80 de 0,5 g% se obtiene una actividad específica del orden de 1.910.000 uAPAM/g.

TABLA III

INFLUENCIA DE LOS TENSIOACTIVOS SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA

Tensioactivos	Concent. (g/%)	Peso seco (g/l)	Valores máximos Activ. proteol. (uAPAM/ml)	Prod.Esp. (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Tiempo de proceso (h)
-	-	6,8	6.000	882	60
LEEN 80	0,05	6,5	6.800	1.046	54
LEEN 80	0,10	6,0	6.500	1.083	54
leato de Na	0,05	6,6	6.200	939	54
leato de Na	0,10	6,4	6.000	937	54
RITON X 100	0,05	0,6	120	200	45
RITON X 100	0,10	0,5	110	220	45
.D.S.	0,05	0,7	160	228	45
.D.S.	0,10	0,6	140	233	45
estigo	-	6,9	4.800	695	60

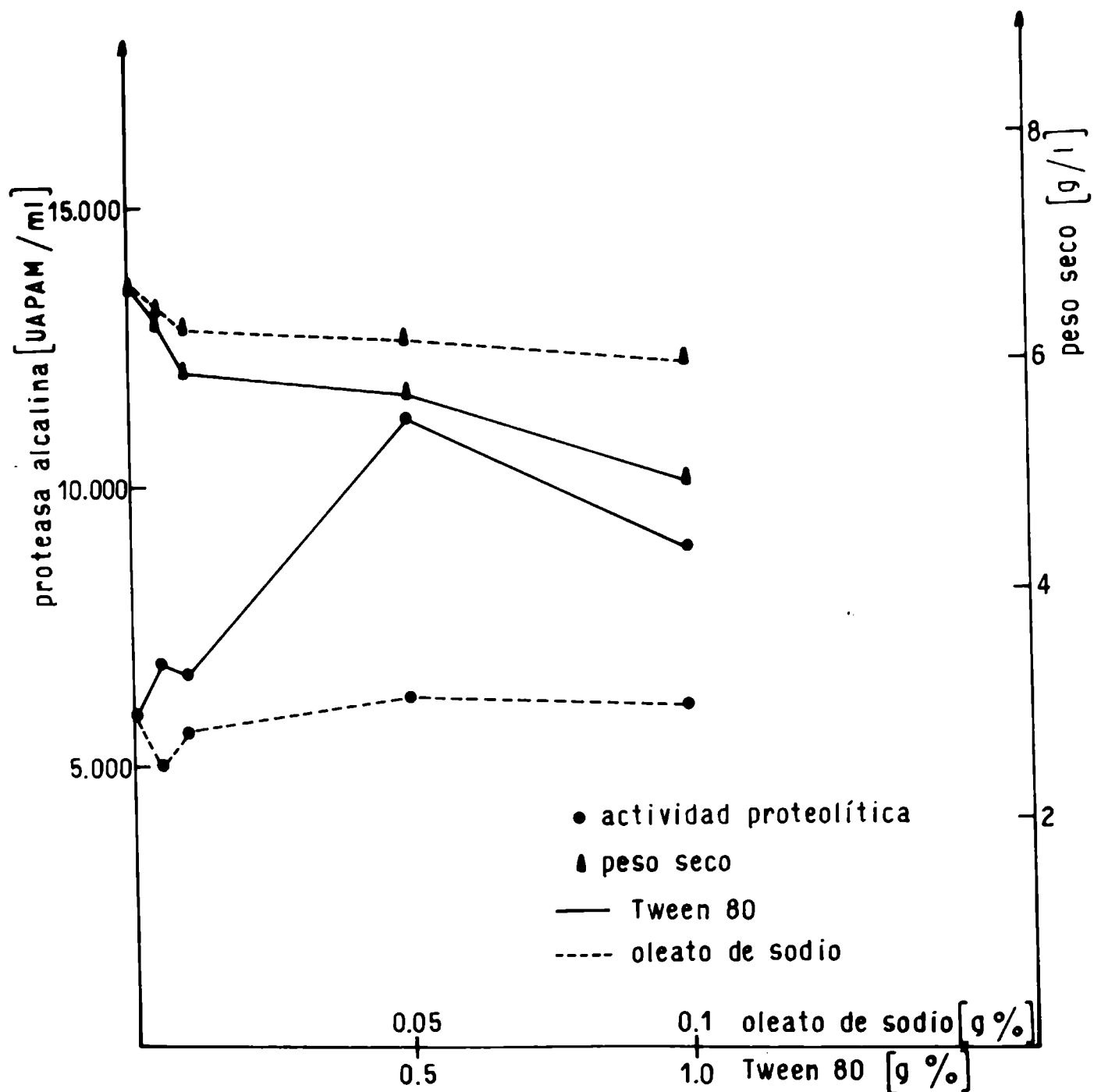
Medio de cultivo empleado, en g/l: lactosa 20; caseína 8; NaCl 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06; KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01; Tensioactivo según tabla.

TABLA IV

INFLUENCIA DEL AGRÉGADO DE TENSIOACTIVOS SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA

Tensioactivos	Conc. (g/%)	Peso seco (g/l)	Valores máximos Activ. proteol. (uAPAM/ml)	Producción Específica (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Tiempo de proceso (h)
-	-	6,8	5.900	867	60
ween 80	0,05	6,5	6.870	1.056	54
ween 80	0,10	6,0	6.600	1.100	54
ween 80	0,50	5,8	11.100	1.913	54
ween 80	1,00	5,0	8.800	1.760	45
leato de Na	0,005	6,6	5.000	757	45
leato de Na	0,010	6,4	5.600	875	45
leato de Na	0,05	6,3	6.200	984	54
leato de Na	0,10	6,1	6.000	983	54
estigo	-	6,9	4.850	702	60

Medio de cultivo empleado en g/l: lactosa 20; caseína 8; NaCl 1,5;
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06; KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01.
 Tensioactivo según tabla.



Influencia de la concentración de surfactantes sobre la máxima producción enzimática y el crecimiento.

Figura 9

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ION CALCIO SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEASA ALCALINA.

En función de la importancia que reviste la presencia del ión calcio en cuanto a su acción estabilizante de la actividad enzimática se hicieron una serie de ensayos donde se varió la concentración de este ión hasta un valor de 6×10^{-3} M. Las concentraciones ensayadas y resultados obtenidos se indican en la tabla V, donde se muestra que la concentración más adecuada es la del medio base, 4×10^{-4} M.

TABLA V

EFFECTOS DE LA CONCENTRACION DE ION CALCIO

Ca^{2+} X 10^4 M	Peso seco (g/l)	Valores máximos Activ. proteol. (uAPAM/ml)	Prod. espec. (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Hora de proceso (h)
0	5,6	5.500	982	60
2	5,7	8.900	1.561	60
4	5,8	11.100	1.913	54
6	6,0	10.200	1.700	54
8	6,2	9.100	1.467	54
10	6,4	8.500	1.328	54
12	6,4	8.400	1.312	54
14	6,9	4.800	695	60

Medio de cultivo empleado, en g/l: lactosa 20; caseína 8; NaCl 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ según tabla; Tween 80 5.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE EDTA SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA

Una vez completados los estudios del efecto de la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, adición de tensioactivos e influencia de la concentración del ión calcio se iniciaron una serie de experiencias donde se consideró el efecto de diferentes concentraciones de EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético) en relación con la producción de proteasas alcalinas. Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla VI donde se ve que dicho agregado tiene un efecto favorable para la producción de la enzima ya que se observa un incremento del 150% en la producción de proteasa con respecto al medio testigo. Por otra parte, también se observa que sobre el crecimiento celular, el aumento de concentración de EDTA produce un efecto desfavorable. La concentración de EDTA que resultó más adecuada para la producción enzimática, fue de $1,5 \times 10^{-4}$ M; para esa condición, se alcanza una actividad en proteasa alcalina de 12.300 uAPAM/ml en 60 horas de proceso.

TABLA VI

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE EDTA SOBRE LA PRODUCCION ENZIMATICA

Concentración de EDTA (M)	Peso seco (g/l)	Prod. Esp. (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Valores máximos Activ. Proteol. (uAPAM/ml)
-	5,7	1.942	11.070
$1,5 \times 10^{-6}$	5,2	1.961	10.200
$1,5 \times 10^{-5}$	4,9	2.155	10.560
$1,5 \times 10^{-4}$	4,5	2.733	12.300
$1,5 \times 10^{-3}$	4,0	2.250	9.000
$1,5 \times 10^{-2}$	3,5	1.400	4.900
Testigo	6,8	720	4.900

Hora de proceso: 60 horas

Medio de cultivo utilizado, en g/l: lactosa 20; caseína 8;

Tween 80 5; NaCl 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06; KH_2PO_4 1,5;

K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01; EDTA variable según tabla.

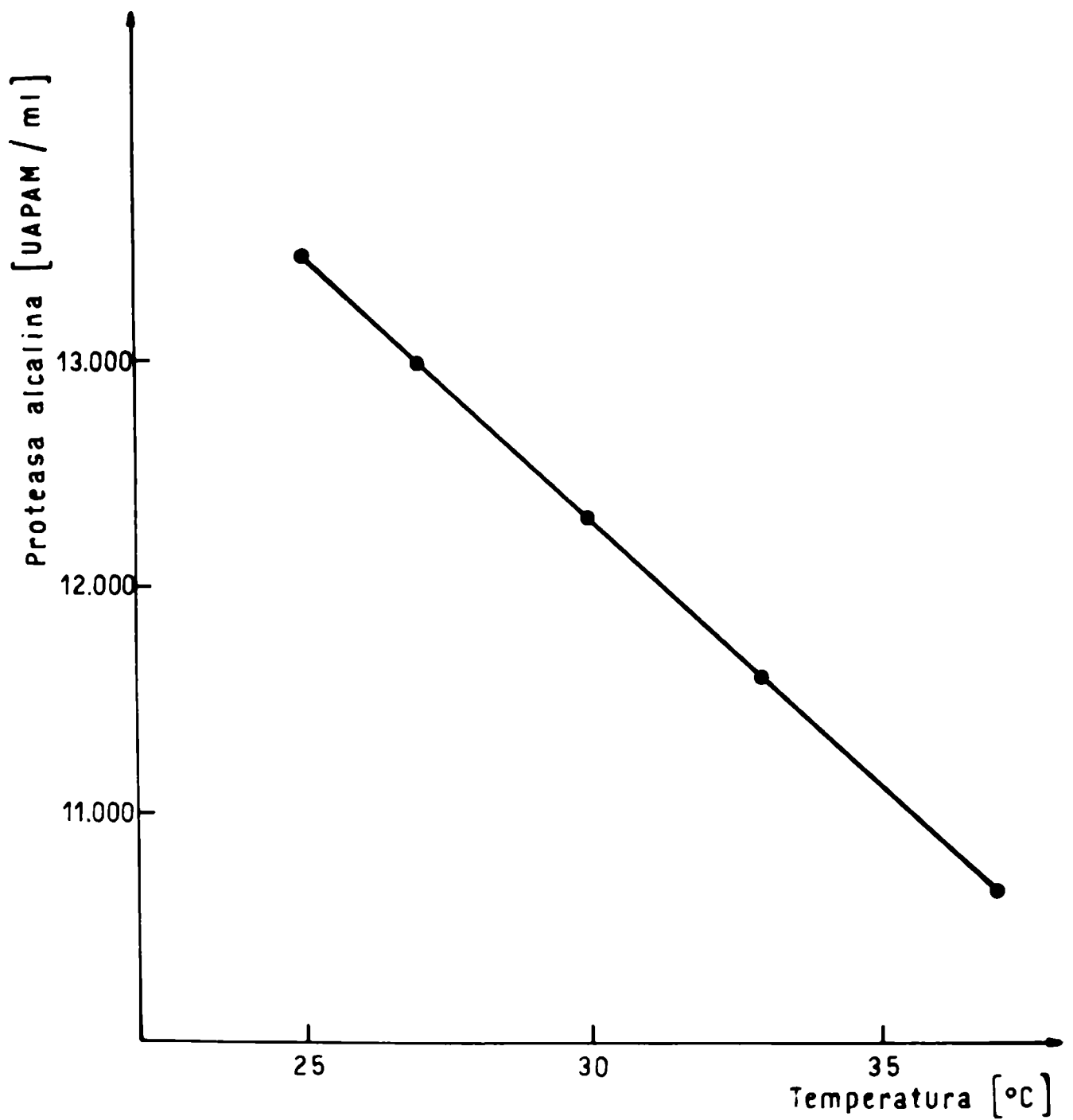
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACION SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEASAS ALCALINAS.

Los estudios de medio de cultivo donde se consideró el efecto de la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, adición de tensioactivos y concentración de EDTA y calcio sobre la producción de proteasas alcalinas permitieron balancear un medio de cultivo con el cual se incrementó la producción enzimática en un 150% con respecto al recomendado por la bibliografía. El caldo de cultivo seleccionado contenía en g/l: lactosa 20; caseína 8; ClNa 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01; Tween 80 5; EDTA 0,056; KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5.

Empleando ese medio líquido se programaron una serie de experiencias donde se estudió el efecto de distintas variables de operación tales como: temperatura, preparación, conservación y volumen de inóculo, y velocidad de absorción de oxígeno sobre la obtención y productividad de proteasa alcalina. Los estudios de influencia de temperatura e inóculos fueron llevados a cabo en erlenmeyers en agitador rotatorio, mientras que los estudios de la influencia de la velocidad de absorción de oxígeno además de la escala de erlenmeyers fueron realizados en fermentadores que operan con y sin agitación mecánica en escala de laboratorio.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA

Tomando como base el trabajo realizado por otros autores (7,26) donde se considera el efecto de la temperatura sobre la producción de enzimas se programaron una serie de experiencias a las temperaturas de: 25, 27, 30, 33 y 37°C, no fue posible utilizar temperaturas más bajas por no disponer de las instalaciones que nos aseguren esa condición de operación, los resultados obtenidos se observan en la figura 10 donde se ve que existe una lineal relación inversa entre la temperatura de operación y la máxima producción enzimática; sin embargo esa correspondencia no se mantiene para el crecimiento, ya que en todos los casos, el mismo fue similar y con un valor máximo de 4,5 g/l. Es importante destacar que a 25°C se alcanza una máxima producción enzimática de 13.500 uAPAM/ml lo que representa un incremento del 10% con respecto a procesos conducidos a 30°C que había sido la temperatura empleada en todas las experiencias anteriores de selección de medio.



Efecto de la temperatura sobre la máxima producción enzimática.

Figura 10

INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE INOCULO

En razón de que la edad y cantidad de inóculo tiene un efecto importante sobre la producción de diversos metabolitos de origen microbiano^(21,24) se realizaron experiencias en erlenmeyers agitados en las cuales se estudió el efecto de diferentes cantidades de inóculos: 1, 5, 8, 10 y 15% del volumen de operación. Los resultados de estas experiencias se indican en la figura 11, donde se observa que si bien las concentraciones finales de proteasa fueron similares, se tuvo un efecto marcado sobre la productividad del proceso, así podemos observar en la figura 12 que empleando inóculos del 5% se alcanza el valor más alto de productividad que es del orden de 205 uAPAM/ml.h.

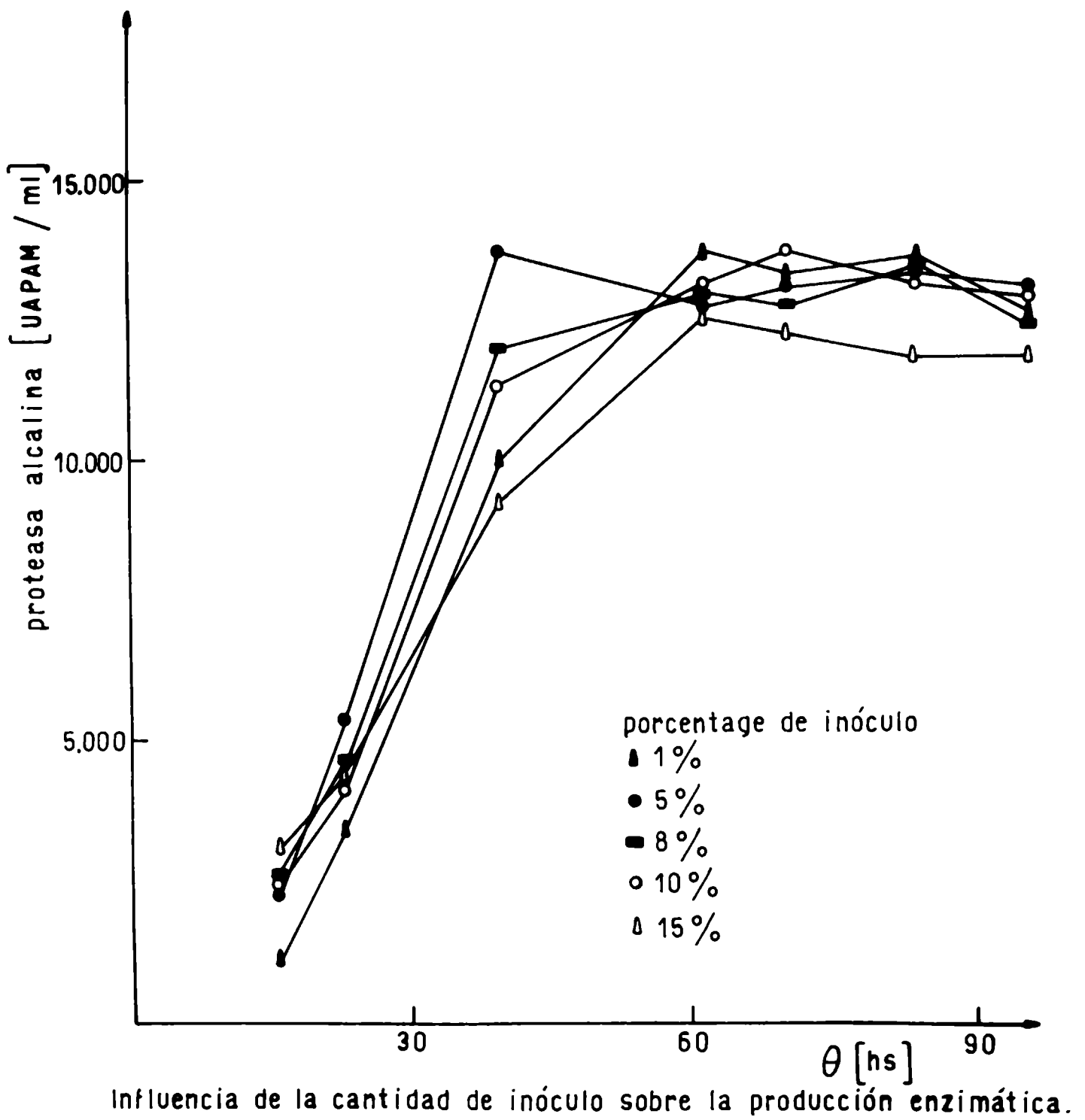


Figura 11

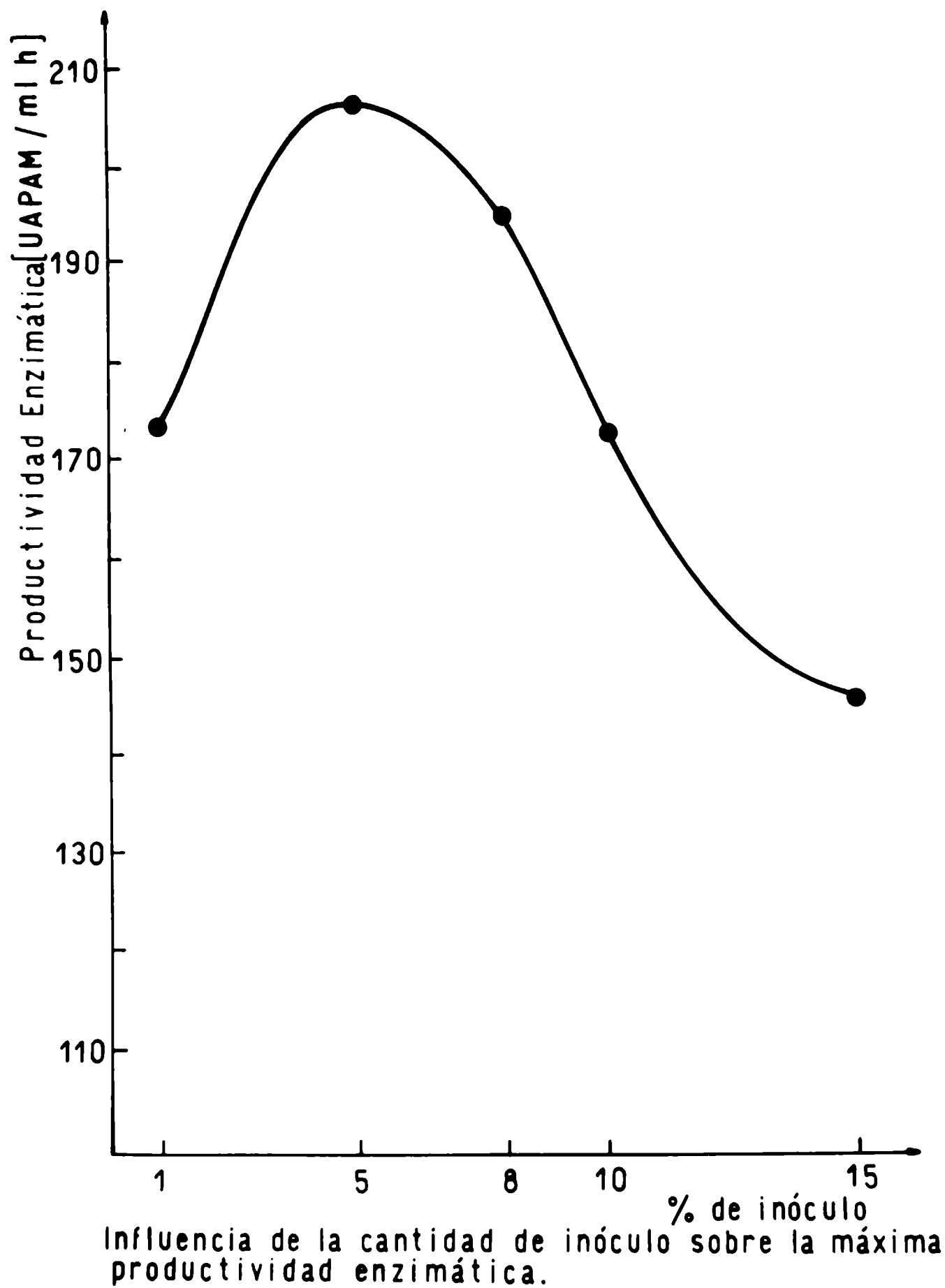


Figura 12

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE OXÍGENO

En virtud de que el oxígeno puede tener un marcado efecto sobre la obtención de distintos productos biosintéticos⁽²⁶⁾, incluyendo las enzimas, es que se programaron una serie de experiencias preliminares que fueron realizadas en erlenmeyers agitados y que posteriormente fueron complementadas en fermentadores de laboratorio. Se emplearon diferentes relaciones de volumen de medio a volumen de frasco: 0,4; 0,2; 0,1 y 0,05, los resultados de estas experiencias se indican en la figura 13 y en la tabla VII. Se observa que se produce un incremento de la actividad enzimática a medida que aumenta la velocidad de absorción de oxígeno hasta alcanzar un máximo de 13.760 uAPAM/ml a 715 ml O₂/l.h, mayores valores de la velocidad de absorción de oxígeno no son aconsejables ya que se produce una disminución en la producción de proteasas alcalinas.

TABLA VII

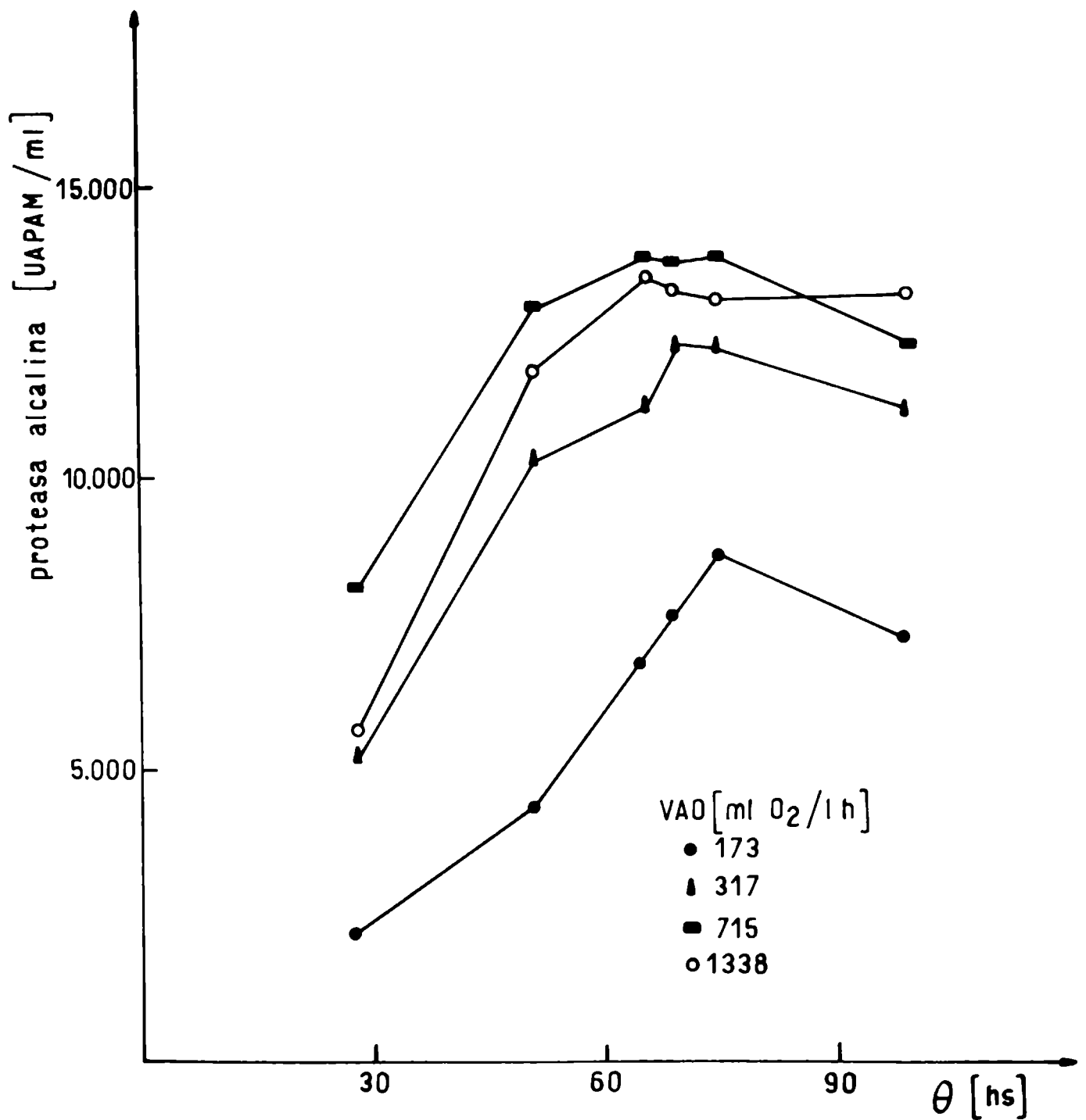
INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ABSORCION DE OXIGENO SOBRE LA PRODUCCION DE
PROTEASAS ALCALINAS

VAO (l O ₂ /l.h)	$\frac{\text{Volumen medio}}{\text{Volumen frasco}}$	Peso seco (g/l)	Prod.Esp. $\times 10^{-3}$	Valores máximos Activ. Proteol. (uAPAM/ml)	Tiempo de Proceso (h)
173	0,4	4,5	1.925	8.663	75
317	0,2	4,5	2.733	12.300	69
715	0,1	4,8	2.866	13.760	65
1.138	0,05	4,8	2.794	13.414	65

Medio de cultivo empleado, en g/l: lactosa 20; caseína 8; ClNa 1,5;
MgSO₄.7H₂O 0,15; CaCl₂.2H₂O 0,06; MnCl₂.4H₂O 0,01; Tween 80 5; EDTA 0,056;
KH₂PO₄ 1,5; Na₂SO₄ 1,5.

Temperatura: 25°C

Inóculo: 5%



Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre la producción enzimática.

Figura 13

ESTUDIOS CON INOCULOS CONGELADOS

Si bien el desarrollo de los procesos en estudio no presentaron inconvenientes en cuanto al comportamiento fisiológico de la cepa, es decir que el sistema de mantenimiento por liofilización y bajo capa de vaselina fueron eficientes, pensando en la aplicación industrial del proceso es que se programaron una serie de ensayos donde se estudió el mantenimiento del microorganismo en estado congelado a la temperatura de -16°C . En la tabla VIII se indican los valores de peso seco de microorganismo, actividad proteolítica volumétrica y producción específica de procesos realizados en erlenmeyers en agitador rotatorio. Los ensayos fueron realizados hasta las 8 semanas procesando una muestra congelada por semana. Los resultados obtenidos muestran que el método de mantenimiento durante ese lapso es muy bueno ya que tanto en el peso seco como en la actividad proteolítica se obtienen valores que no varían en este período de tiempo (peso seco 4,9 g/l ; actividad proteolítica 13.800 uAPAM/ml).

TABLA VIII

EXPERIENCIAS REALIZADAS CON INOCULOS CONGELADOS

Tiempo en semanas	Peso seco (g/l)	Prod. espec. (uAPAM/g) $\times 10^{-3}$	Valores máximos Activ. Proteol. (uAPAM/ml)
0	4,9	2.816	13.850
1	4,9	2.816	13.800
2	4,8	2.854	13.700
3	4,8	2.864	13.750
4	4,9	2.816	13.800
5	4,8	2.854	13.700
6	4,8	2.854	13.700
7	4,9	2.816	13.800
8	4,9	2.816	13.800
5culo fresco	4,9	2.816	13.800

Medio de cultivo empleado, en g/l: lactosa 20; caseína 8; NaCl 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06; KH_2PO_4 1,5; K_2HPO_4 1,5; Na_2SO_4 1,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,01; Tween 80 5.

Temperatura: 25°C

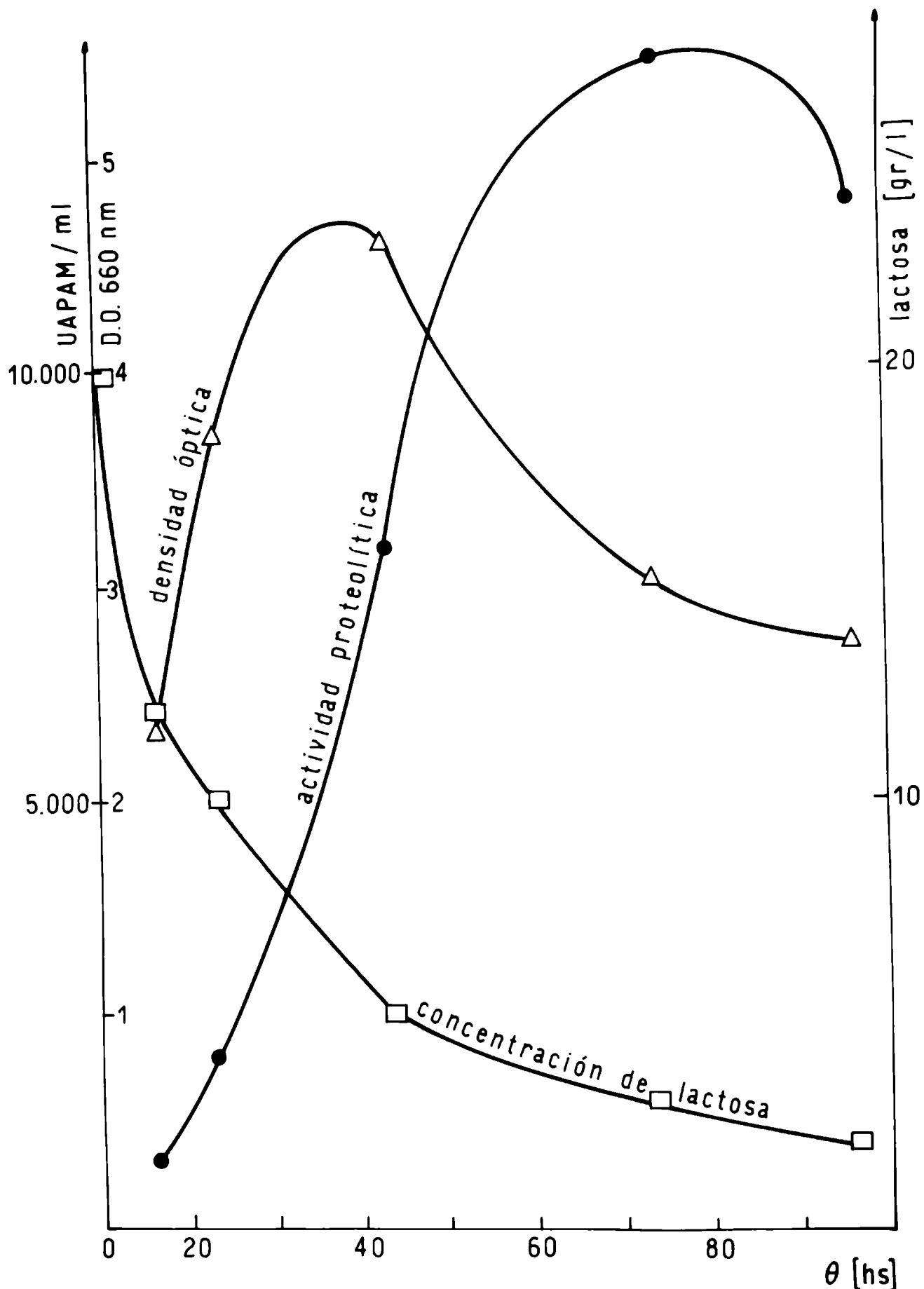
Inóculo: 5%

VAO: 715 ml O_2 /l.h

GRAFICA DE UN PROCESO TIPICO

En la figura 14 se muestra la gráfica correspondiente a un proceso típico con el medio de cultivo y condiciones operacionales resultante de los ensayos efectuados en escala de frascos agitados.

En la misma se pueden observar la evolución del consumo de lactosa, crecimiento y producción enzimática; cabe destacar el desfasaje temporal existente entre la máxima concentración celular y la máxima cantidad de enzima, lo que indica que la producción enzimática está directamente asociada al desarrollo celular y se acentúa hacia los estadios finales de desarrollo o sea en la idiofase. Otro hecho importante es que la concentración residual de la fuente de carbono en los caldos fermentados es mínima, lo que indica un óptimo aprovechamiento de la misma.



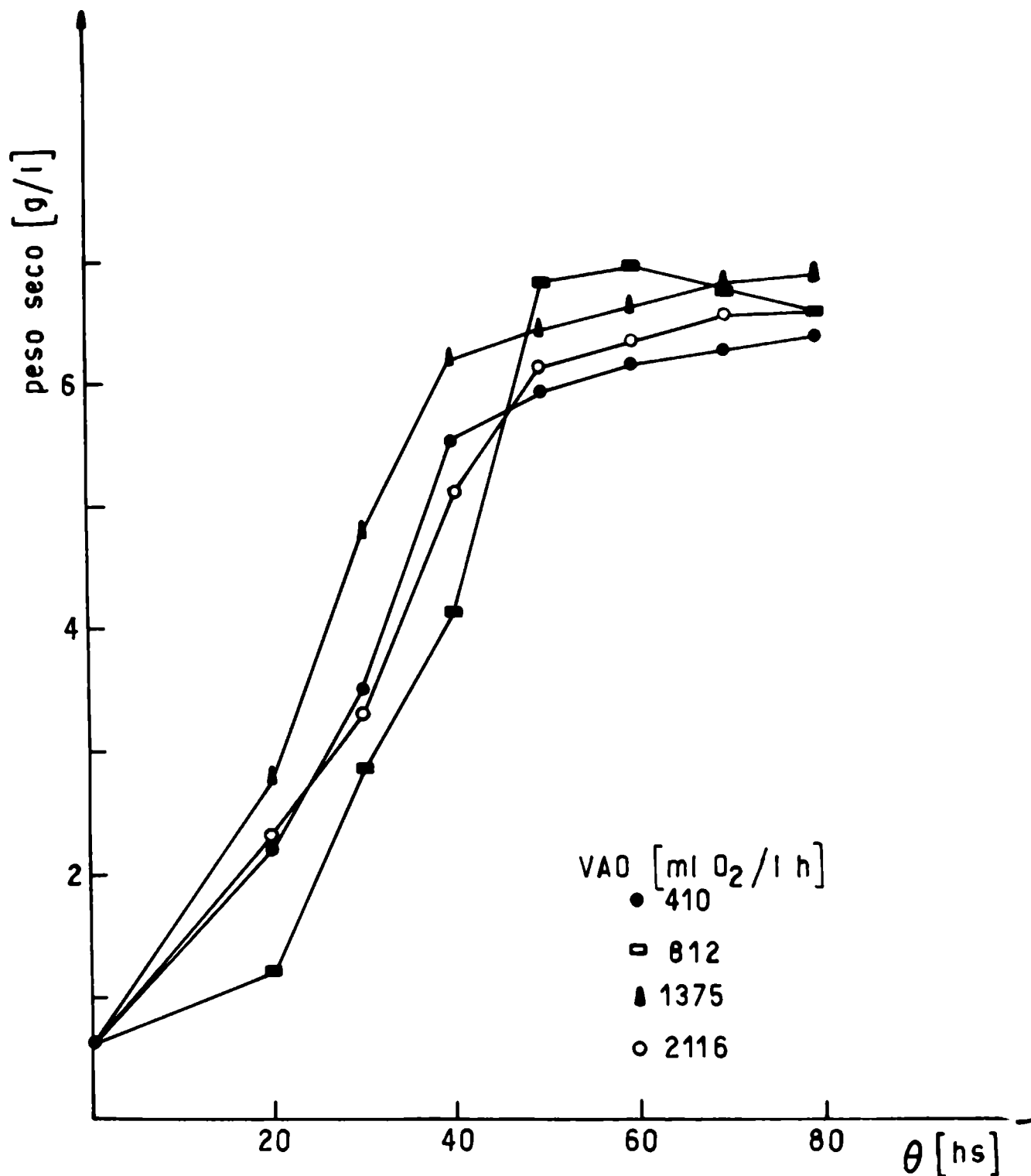
Gráfica de un proceso con un medio de cultivo resultante de los ensayos efectuados para una cepa de *Bacillus subtilis* NRRL 3411.

Figura 14

ESTUDIOS REALIZADOS EN FERMENTADORES CON AGITACIÓN MECÁNICA

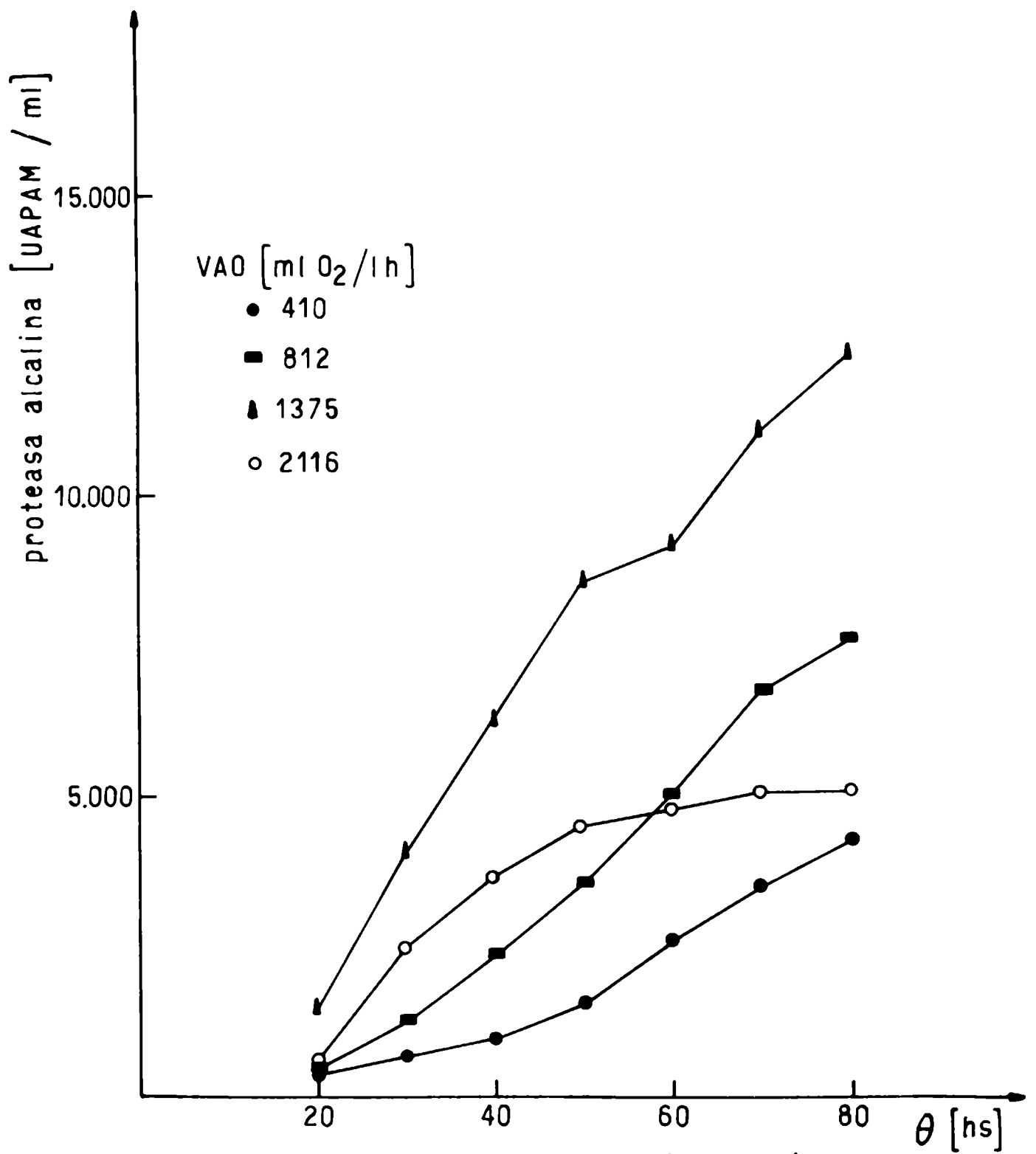
En las figuras 15, 16, 17 y 18 se presentan los resultados obtenidos en una serie de experiencias realizadas en fermentadores de tipo convencional con agitación mecánica donde se estudió la producción de proteasa alcalina para diferentes condiciones de aeración las cuales fueron previamente establecidas en función de la velocidad de absorción de oxígeno.

Observando las figuras a las que se ha hecho referencia se ve que a medida que se incrementa la velocidad de agitación para un mismo caudal de aire aumenta la producción enzimática hasta alcanzar un valor de 1.823.529 uAPAM/g para una velocidad de absorción de oxígeno de 1.375 ml O₂/l.h trabajando a 500 rpm caudal de aire 1 l/l.min. a 25°C de temperatura; mayores valores de agitación producen un efecto desfavorable en cuanto a la producción de la enzima, con respecto al peso seco se advierte que no existen diferencias significativas para todos los procesos obteniéndose valores comprendidos entre 6,3 y 6,8 g/l. Por otra parte se destaca que la lactosa se consume en menor tiempo para el proceso conducido al más alto valor de aeración empleado que corresponde a una agitación de 600 rpm y una velocidad de absorción de oxígeno de 2.226 ml/l.h para un caudal de aire de 1 l/l.min..



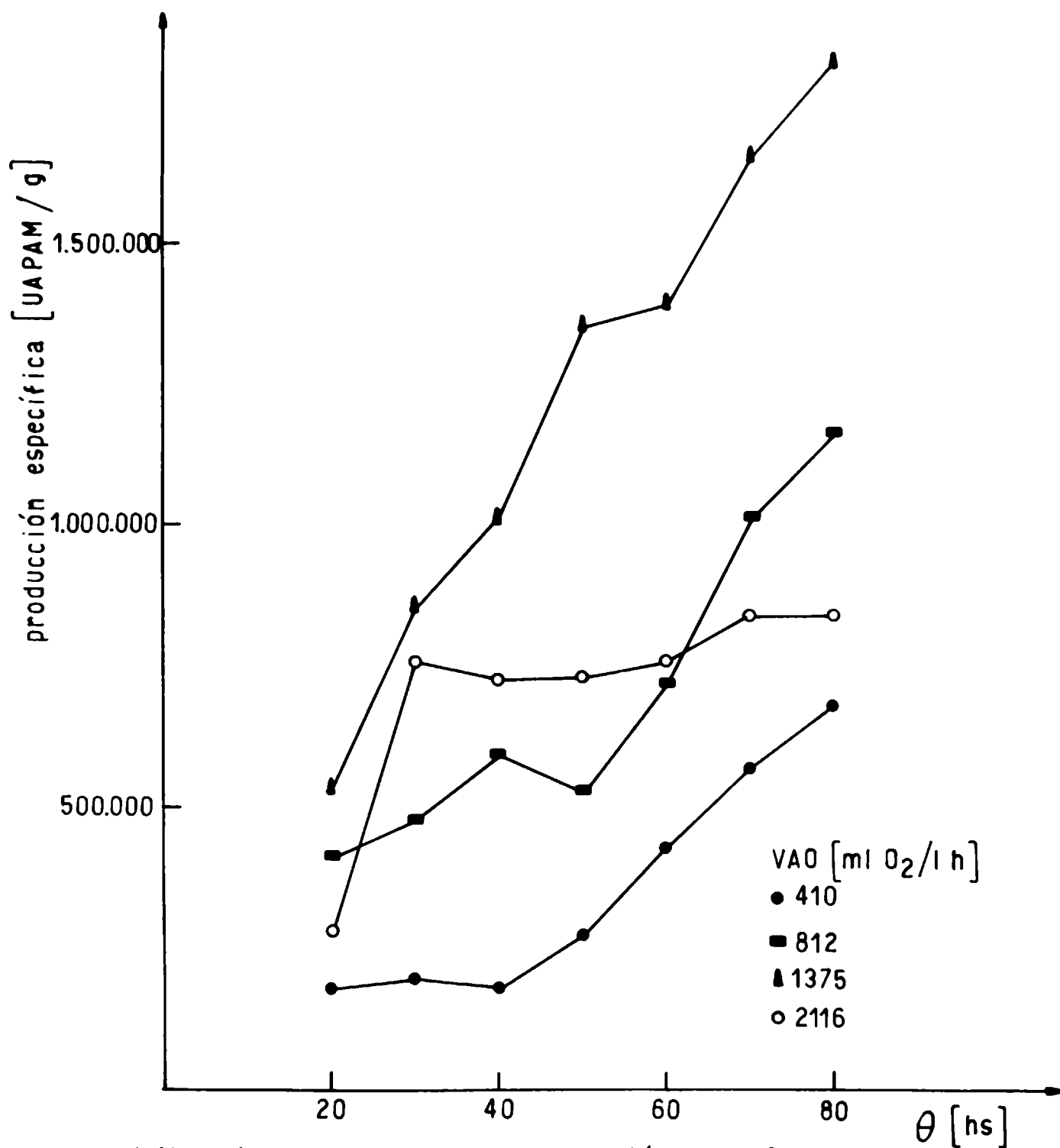
Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre el crecimiento celular en un fermentador con agitación mecánica.

Figura 15



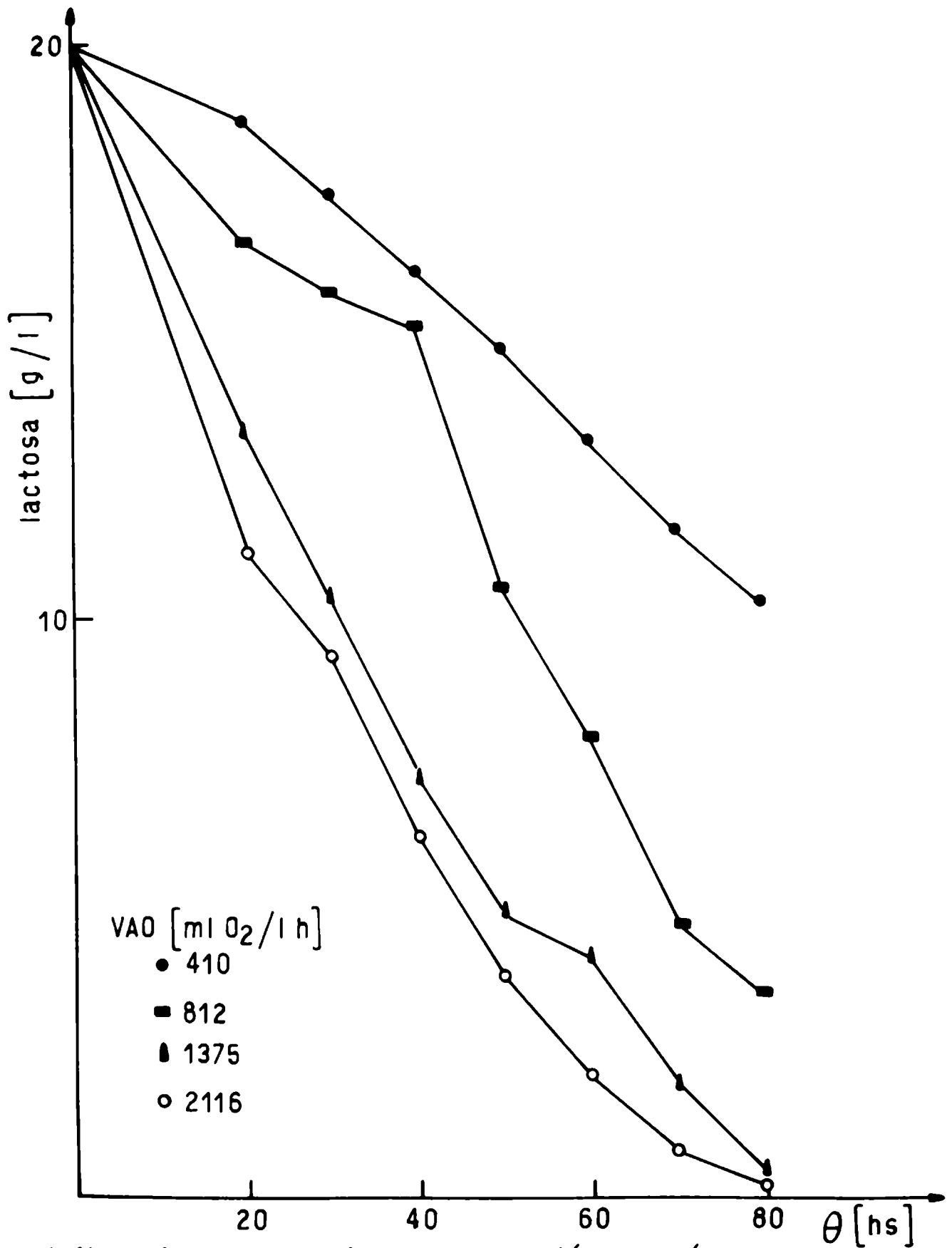
Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre la producción enzimática en un fermentador con agitación mecánica.

Figura 16



Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre la producción enzimática específica en un fermentador con agitación mecánica.

Figura 17



Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre el consumo de lactosa en un fermentador con agitación mecánica.

Figura 18

ESTUDIOS DE OBTENCION DE PROTEASAS ALCALINAS EN UN FERMENTADOR CON CIRCULACION DE LIQUIDO POR INYECCION DE AIRE.

En la tabla IX y en las figuras 19, 20, 21 y 22 se indican los valores obtenidos en este simple reactor, de las condiciones ensayadas: 4, 5 y 6 litros de aire por minuto el máximo valor de producción específica de proteasa alcalina de 1.100.000 uAPAM/g se obtiene cuando se emplea un caudal de aire de 5 l/min. que corresponde a una velocidad de absorción de oxígeno de 162 ml O₂/l.h determinadas previamente; a un caudal mayor de aire, 6 l/min., no se observa un aumento en la producción de la enzima. Es importante destacar que en los procesos desarrollados en este reactor se producen importantes cantidades de espuma, lo que nos obligó a agregar antiespumante en abundancia. La formación de espuma dificultó muchas veces la medida de peso seco, ya que esto tendía a depositar los microorganismos en las paredes del fermentador, no obstante los valores observados en la tabla no difieren mucho con los obtenidos en el fermentador tipo convencional.

TABLA IX

INFLUENCIA DE LA AERACION SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEASA ALCALINA EN FERMENTADORES SIN AGITACION MECANICA

Hora de Proceso (h)	Activ. Proteol. (uAPAM/ml)	Peso seco (g/l)	Lactosa (g/l)	Prod. específica $\times 10^{-3}$ (uAPAM/g)
20	700	4,2	18,0	166
30	1.450	5,8	15,6	250
40	2.550	6,8	13,5	375
50	4.050	6,2	10,5	653
60	6.150	5,8	8,6	1.060
70	7.250	6,7	7,9	1.082
80	7.000	6,7	6,8	1.044

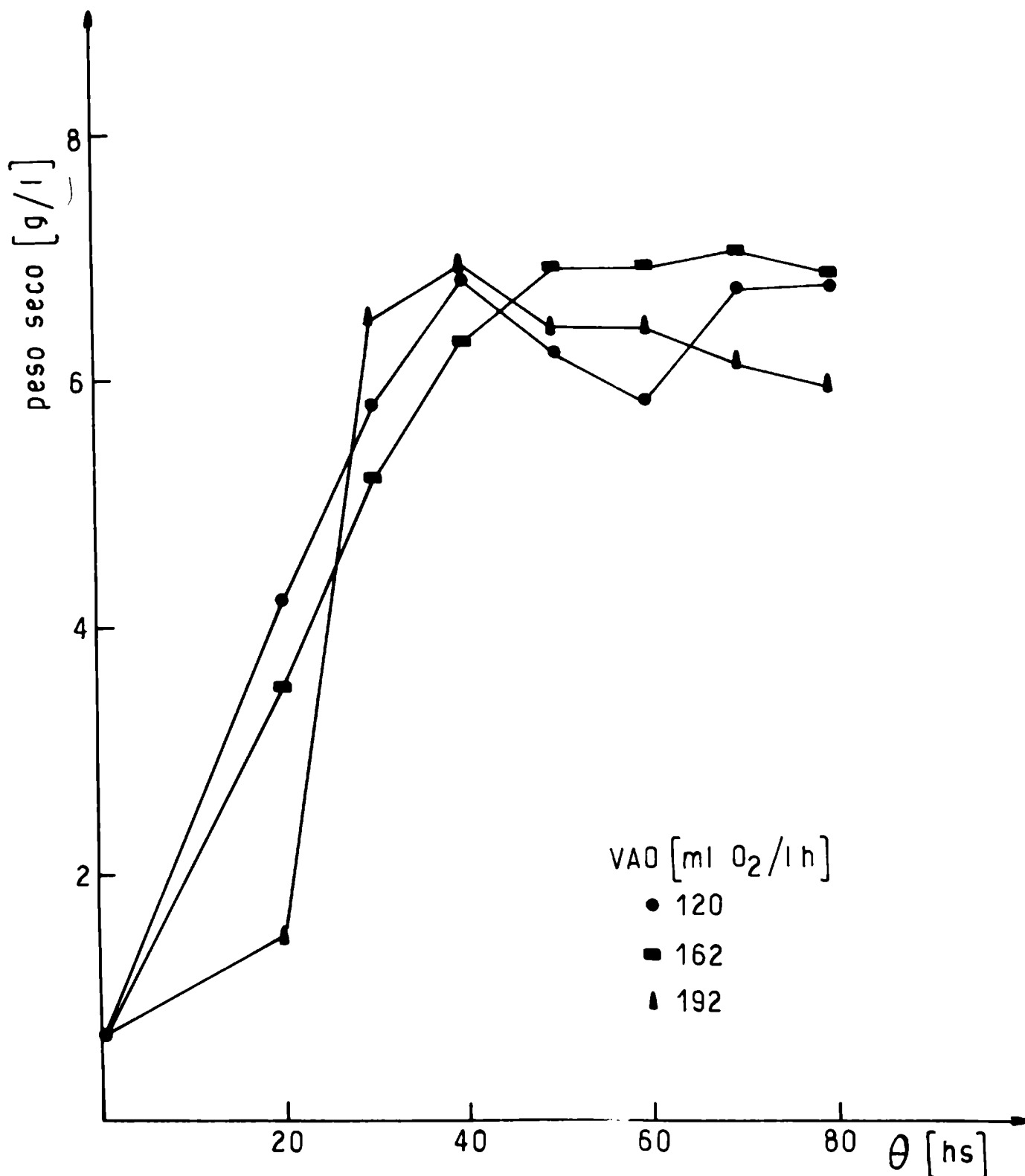
VAO 120 ml O₂/l.h (4 l/min.)

20	1.400	3,5	17,7	400
30	3.900	5,2	14,8	750
40	6.050	6,3	12,0	960
50	6.800	6,9	8,7	985
60	7.150	6,9	6,8	1.036
70	7.700	7,0	4,6	1.100
80	7.200	6,8	3,1	1.058

VAO 162 ml O₂/l.h (5 l/min.)

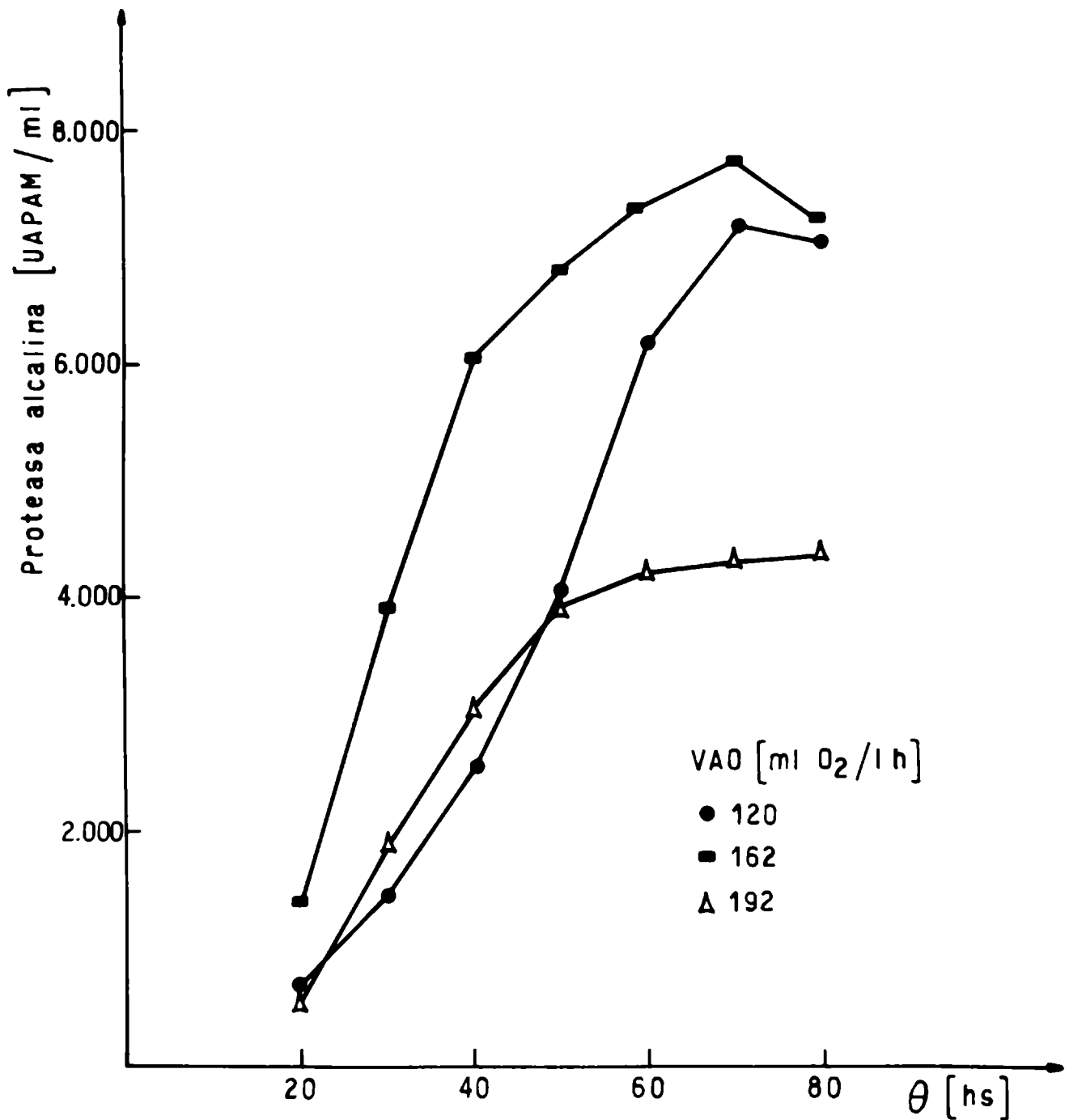
20	600	1,5	17,8	700
30	1.900	6,5	13,5	292
40	3.050	6,9	12,3	442
50	3.950	6,4	11,2	617
60	4.200	6,4	8,7	656
70	4.300	6,1	8,1	704
80	4.350	5,9	7,6	737

VAO 192 ml O₂/l.h (6 l/min.)



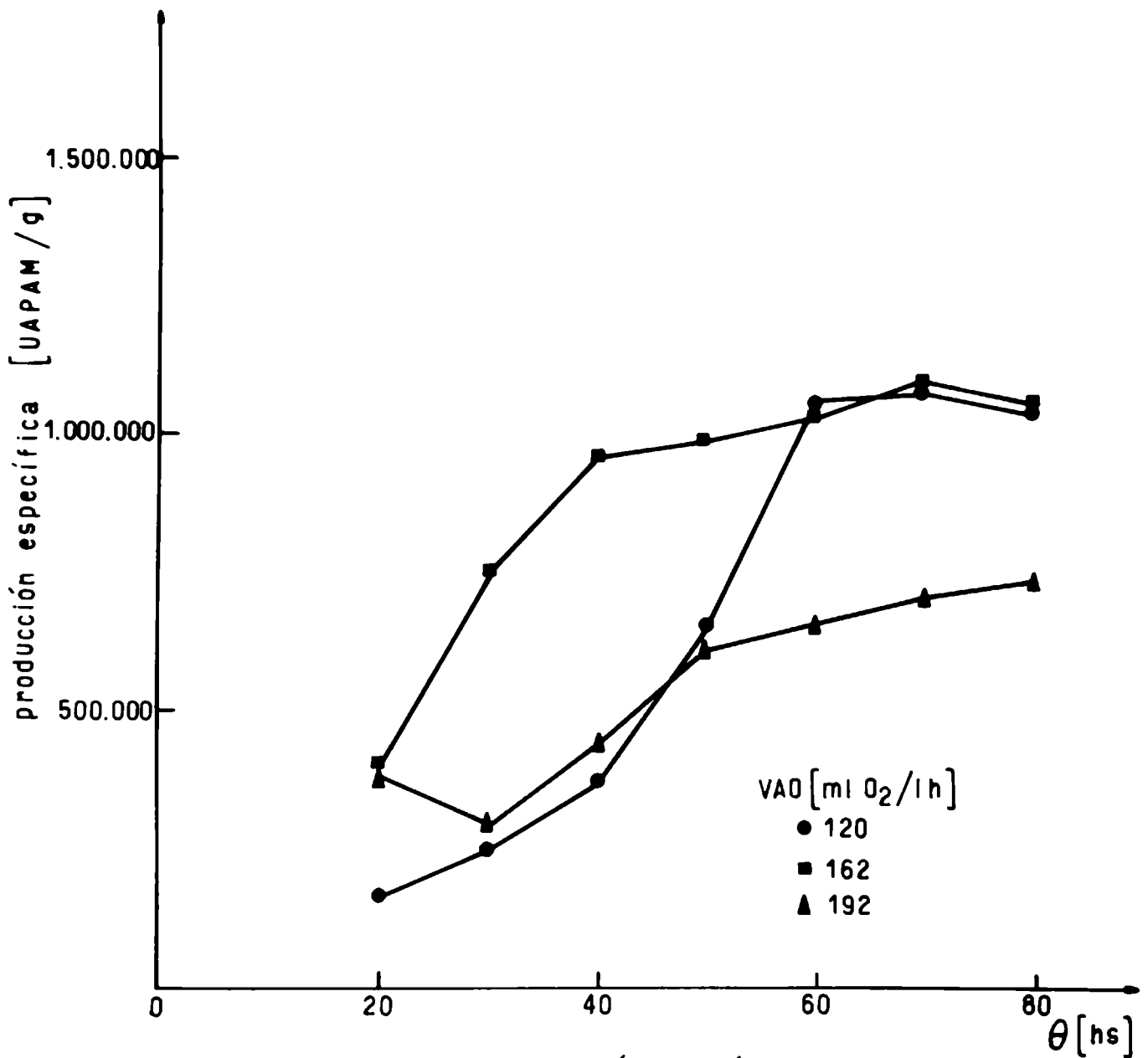
Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre el crecimiento celular en fermentadores con agitación por circulación de líquido.

Figura 19



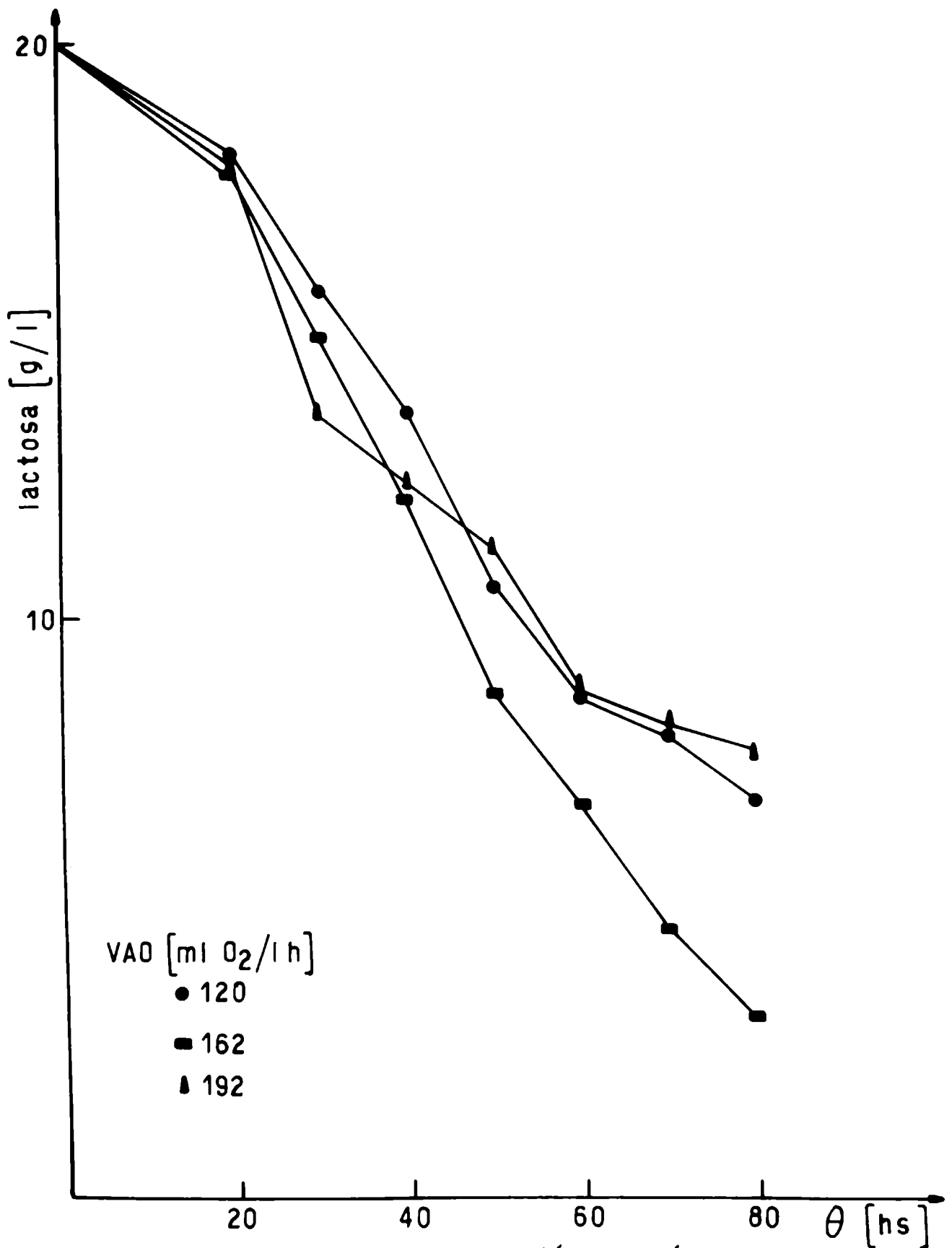
Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre la producción enzimática en un fermentador con agitación por circulación de líquido.

Figura 20



Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre la producción enzimática específica en un fermentador con agitación por circulación de líquido.

Figura 21

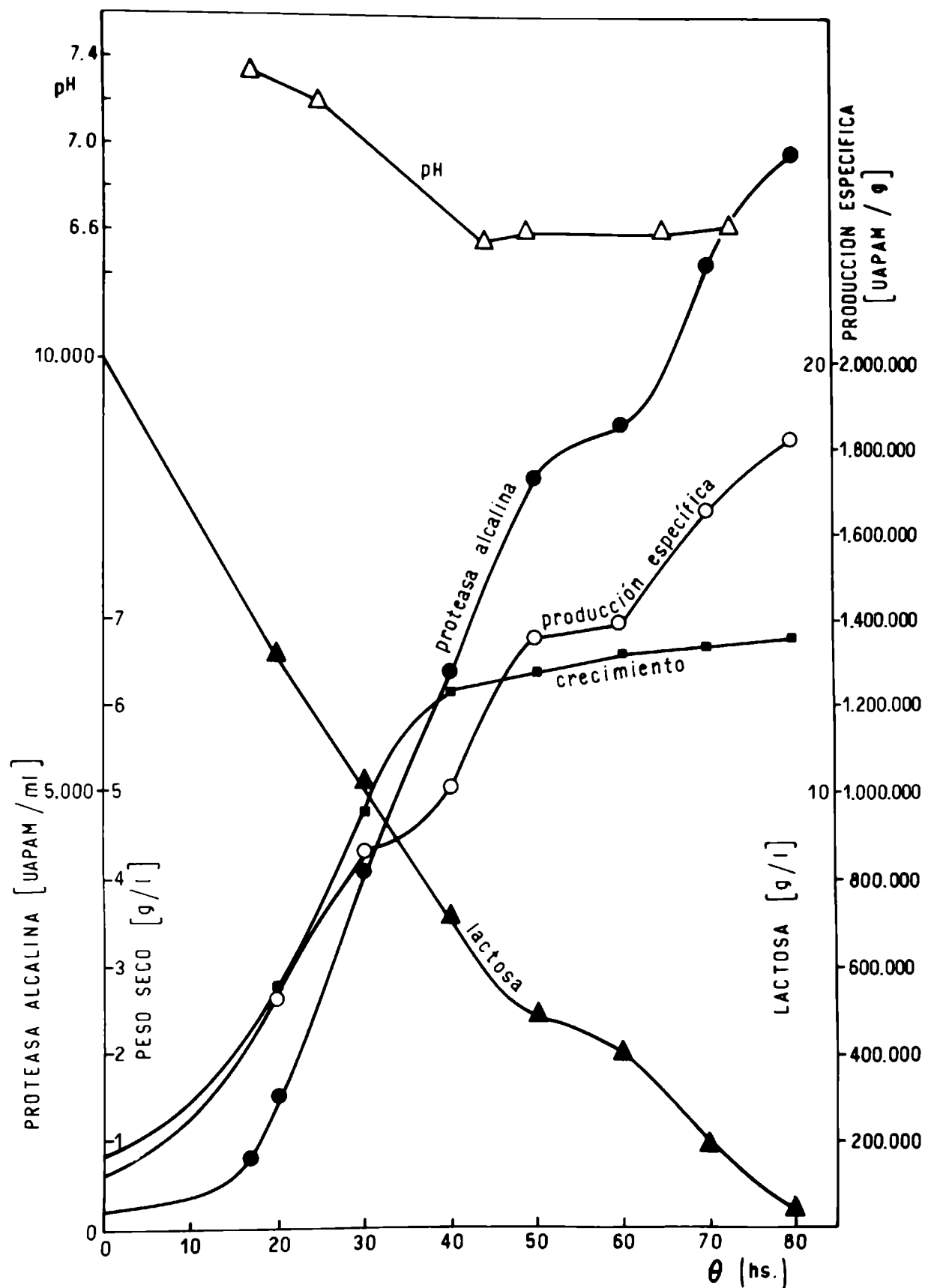


Influencia de la velocidad de absorción de oxígeno sobre el consumo de lactosa en fermentadores con agitación por circulación de líquido.

Figura 22

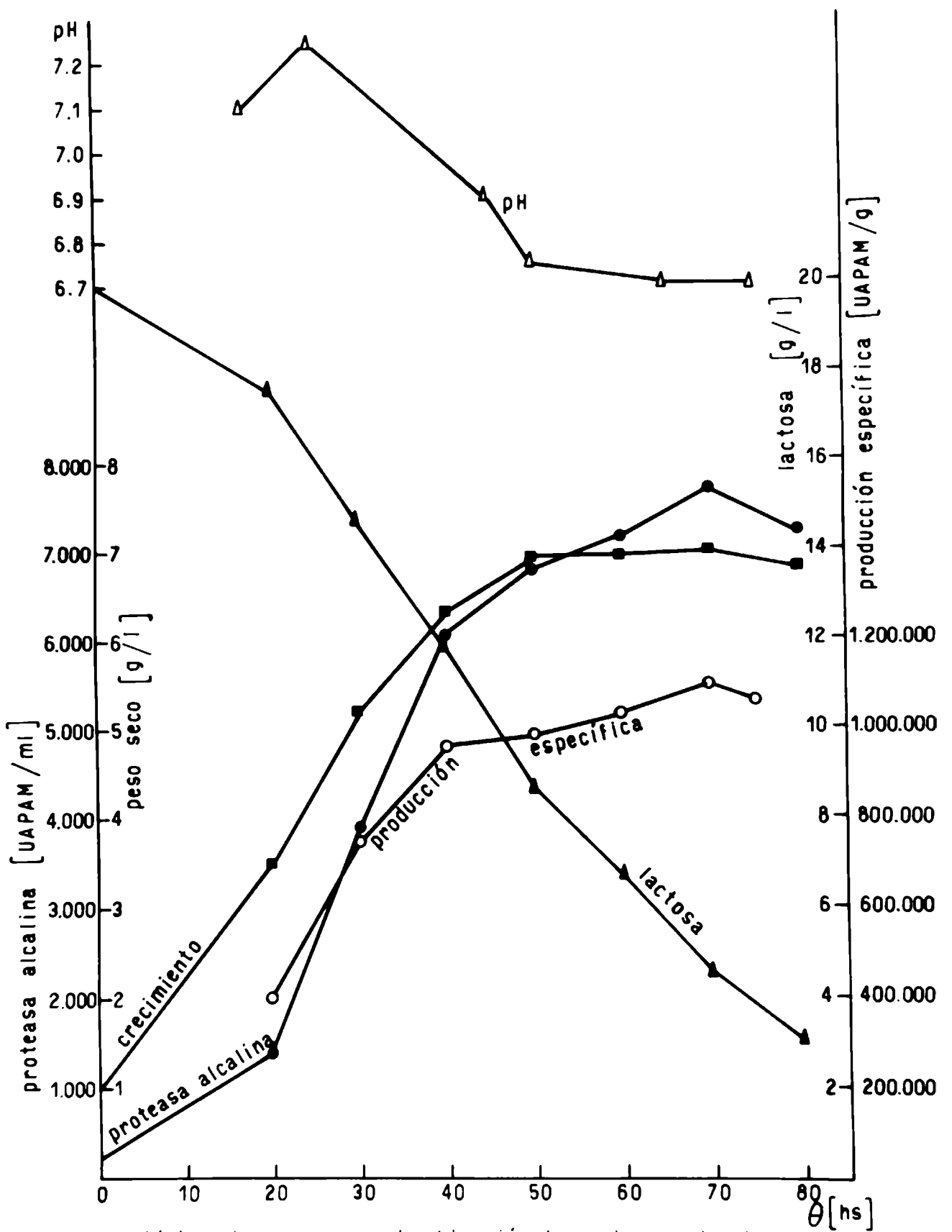
CURVAS DE EVOLUCION DE LOS PARAMETROS DE FERMENTACION DE PROCESOS TIPICOS EN REACTORES EN ESCALA DE LABORATORIO

En las figuras 23 y 24 se muestra la evolución de los parámetros: consumo de lactosa, producción de proteasa, pH y crecimiento celular, para procesos típicos que fueron realizados en fermentadores con y sin agitación mecánica. Las curvas corresponden a procesos en los cuales se obtuvieron para cada caso los más altos rendimientos de enzimas, de los resultados obtenidos como observación general surge que si bien la evolución de los parámetros presenta un comportamiento similar, en valores absolutos los niveles de proteasa alcalina son superiores en el caso de las fermentaciones realizadas en el reactor agitado mecánicamente.



Curvas típicas en un fermentador con agitación mecánica
 Volúmen de operación 3 litros. Velocidad de agitación 500 r.p.m.
 Caudal de aire 3 l/minutos. Temperatura 25°C.

Figura 23



Curvas típicas de un proceso de obtención de proteasa alcalina en un fermentador con circulación de líquido por inyección de aire : Volúmen de operación 3 litros. Caudal de aire 5 l/min. Temperatura 25 °C

Figura 24

DISCUSION

De los estudios efectuados sobre la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno, tales como peptona Difco, hidrolizado pancreático de caseína, hidrolizado pancreático de hígado, digerido trípico de caseína, caseína y mezclas de éstas, etc., la mayor concentración de enzimas fue obtenida cuando se empleó caseína; este efecto puede ser atribuido a que la utilización de las otras fuentes nitrogenadas suministran al medio de cultivo una alta concentración de aminoácidos y polipéptidos de bajo peso molecular libres que actuarían reprimiendo la producción enzimática^(28, 3, 20, 29, 38).

En lo que se refiere al estudio de la influencia de tensioactivos, el agregado de algunos de éstos al medio de cultivo produce una acción favorable sobre la producción de enzimas, ya que los resultados obtenidos demostraron que el agregado de Tween 80 en concentración de 0,5% incrementa la cantidad de enzima en un 130% con respecto al testigo. Es importante destacar que este efecto podría estar relacionado, por una parte, a la estabilización de la estructura enzimática en el medio de fermentación⁽³⁷⁾ y por otro a una alteración de la membrana celular modificando su permeabilidad⁽³³⁾, lo que facilitaría la secreción de la enzima al medio, y como la cantidad de enzima a nivel de membrana tiende a mantenerse constante (control de retroalimentación) aumentaría su producción⁽⁷⁾. La disminución del crecimiento celular observada al incrementar la concentración de Tween 80 hasta el 0,5%, podría atribuirse a que la mayor producción enzimática conduciría a una menor disponibilidad de intermediarios para la formación de biomasa. A mayores concentraciones de Tween 80 (1%) también disminuye la producción enzimática debido a alteraciones más profundas que pueden llegar incluso a la lisis celular⁽⁷⁾.

En cuanto a la influencia de la concentración del ión calcio y EDTA, de los resultados obtenidos se desprende que una concentración de ión calcio de 4×10^{-4} M, nos asegura altos rendimientos de proteasa alcalina, esto se debe a que el ión calcio actúa como estabilizante de la proteasa alcalina y el EDTA actuaría

complejando iones metálicos pesados⁽³⁰⁾, tales como Cu^{2+} y Zn^{2+} que pueden hallarse como impurezas de las drogas constituyentes del medio de cultivo, que son inhibidores tanto de la producción enzimática⁽²⁷⁾ como de la enzima debido a que pueden unirse a los grupos sulfhidrilo del sitio activo de la enzima, modificando su actividad en forma irreversible⁽¹⁰⁾. Por otra parte, la disminución observada por aumento de la concentración de EDTA, por valores superiores al indicado, tanto en la producción enzimática como en el crecimiento, podría ser explicada por una acción secuestrante sobre el ión calcio y sobre elementos menores, que son necesarios para el normal metabolismo celular⁽³⁰⁾.

La marcada influencia de la temperatura sobre la producción de proteasa alcalina, puede explicarse aceptando la formación de un represor endógeno. Al disminuir la velocidad de crecimiento del microorganismo, por disminución de la temperatura, el nivel de represor estaría por debajo de un valor crítico, lo cual produciría una derrepresión de la síntesis enzimática. Por otra parte, esto contribuiría a un menor consumo de inductores de la producción enzimática^(7,20).

Considerando las experiencias en frascos agitados empleando distintas relaciones volumétricas, se muestra que, para la relación 0,1 se obtienen los mayores rendimientos enzimáticos y que menores relaciones no favorecen la producción de la enzima. Este efecto puede ser atribuido a que, para estas condiciones, se satisfacen los requerimientos de aeración y nutricionales del microorganismo para la misma producción enzimática.

Con respecto a los ensayos efectuados en fermentadores en escala de banco, es interesante destacar el brusco descenso que ocurre en la producción específica desde 1.823.529 uAPAM/g con una agitación de 500 rpm hasta 784.615 uAPAM/g a 600 rpm; este efecto, puede ser atribuido a una modificación de la forma de crecimiento del microorganismo. Para condiciones de máxima producción, el microorganismo se presenta en agregados celulares de forma variable, la cual no se conserva a valores de agitación más altos de 500 rpm. Es probable que sea la agitación la responsable de esta modificación, disminuyendo sensiblemente la

producción enzimática.

En cuanto a la eficiencia de la columna, tenemos que considerar que a altos caudales de aire se incrementa la formación de espuma, lo que obliga a agregar importantes cantidades de anti-espumante; ésta podría ser una de las causas de la disminución de la actividad enzimática; puesto que esta sustancia modifica la tensión interfacial en el medio de cultivo, lo que dificultaría los fenómenos de transporte. Por otra parte los bajos valores de actividad comparados con el fermentador agitado, podrían ser explicados por una menor velocidad de suministro de oxígeno, como así también por los tiempos de mezclados que son sensiblemente mayores que en el equipo convencional.

CONCLUSIONES

De los estudios realizados surgen las siguientes conclusiones: 1) En lo que se refiere al balance de medios de cultivo se ha demostrado que la caseína resultó ser la fuente de nitrógeno de elección, ya que además de ser económica con respecto a las ensayadas su incorporación a los medios de fermentación incrementa la producción enzimática en un 30% con respecto al medio original. Por otra parte, es de destacar que la modificación introducida en lo que se refiere al agregado de tensioactivos produce un notable efecto sobre los rendimientos de proteasa alcalina., alcanzándose valores del orden de 1.900.000 uAPAM/g.

2) En lo que se refiere a temperatura se concluye que en el rango de temperaturas considerado la más apropiada fue de 25°C.

3) En cuanto a las experiencias en fermentadores, es de destacar que se ha optimizado las condiciones de operación demostrándose que con un medio balanceado y una velocidad de absorción de oxígeno de 1.375 ml O₂/l.h en 80 horas de proceso se obtiene en fermentadores convencionales con agitación mecánica una concentración de enzima del orden de 12.400 uAPAM/ml.

En este trabajo se establecen las siguientes condiciones tecnológicas para la obtención de proteasas alcalinas:

Medio de cultivo (g/l): Lactosa 20; Caseína 8; ClNa 1,5; MgSO₄·7H₂O 0,15; CaCl₂·2H₂O 0,06; MnCl₂·4H₂O 0,01; Tween 80 5; EDTA 0,056; KH₂PO₄ 1,5; K₂HPO₄ 1,5; Na₂SO₄ 1,5.

Temperatura: 25°C.

Velocidad de absorción de oxígeno: 1.375 ml O₂/l.h.

Volumen de inóculo: 5%.

Estas condiciones operativas ofrecen la posibilidad de alcanzar altos rendimientos en proteasa alcalina, en fermentadores en escala de laboratorio, obteniéndose así los siguientes valores de producción:

Proteasa alcalina uAPAM/ml	12.400
Producción específica uAPAM/g	1.823.529
Productividad uAPAM/ml.h	155
Productividad específica uAPAM/g.h	22.744

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'O. K. K.', is written over the bottom right portion of the table. The signature is stylized and somewhat illegible.

BIBLIOGRAFIA

1. Brice, W.W.: Manufacturing uses of enzymes. Food Manufacture Ingredients Survey. January, 1966, 18-20.
2. Breed, R.S.; Murray, E.G.D.; Smith, N.R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Publ. Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. (1957).
3. Chaloupka, J. and Kreckova, P.: Protease repression in *Bacillus megaterium*. K.M.Biochem.Biophys.Res.Commun. 8:120-4 (1962).
4. Cooper, C.M.; Fernston, G.S.; Miller, S.A.: Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind.Eng.Chem. 36:504-0 (1944).
5. Daguerre, R.; Cuevas, C.M.; Mazza, L.A.; Balatti, A.P.: Estudios sobre obtención de proteasas alcalinas. Rev.Asoc.Arg. Microbiol. 7:49-55 (1975).
6. Ertola, R.J.; Balatti, A.P.; Mazza, L.A.; Daguerre, R.: Estudios sobre un fermentador en columna. Ind.Quím. 24: 225-8 (1965).
7. Faith, W.T.; Neubeck, C.E.; Reese, E.T.: Production and applications of enzymes. Advances in Biochemical Engineering. Vol. 1, Ed. by T.K.Ghose and Fietcher (1971).
8. Fitzgerald, R.J.; Spinell, D.M.; Stoudt, T.M.: Enzymatic removal of artificial plaques. Arch.Gral.Biol. 13:125 (1968).
9. Fogarty, W.M.; Griffin, P.J.; Joyce, A.M.: Enzymes of *Bacillus* Species. Part 2. Process Biochem., 9: 27-35 (1974).
10. Gould, B.J.: Principles of Industrial Enzymology. Handbook of Industrial Biotechnology. Ed. Alan Wiseman; Ellis Horwood Publisher. 5-26 (1975).
11. Gutelberg, A.; Ottesen, M.: Purification of the proteolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie Chimique, Vol. 29, N°3:4(1954).

12. Hagihara, B.: Bacterial and Mold Proteases. The Enzymes (Academic Press) Vol. 4: 193-213 (1960).
13. Hyvarinen, A.; Nikkila, E.A.: Specific determination of blood glucose with O-Toluidine (Malni Hosp. Helsinki) Clin.Chem.Acta. 7: 140-3 (1962).
14. Keay, L.; Moseley, M.H.; Anderson, R.G.; O'Connor, R.J.; Wildi, B.S.: Production and isolation of microbial proteases. Biotechnol. and Bioeng. Symp. N°3: 63-92 (1972).
15. Keay, L.; Wildi, B.S.: Protease of the genus Bacillus. Biotechnol. and Bioeng. 12:179, 249 (1970).
16. Keay, L.: Proteases of the genus Bacillus. Proc. IV I.F.S. Ferment.Technol.Today, 289-98 (1972).
17. Keay, L.; Moser, P.; Wildi, B.S.: Proteases of the genus Bacillus, II. Alkaline Proteases. Biotechnol. and Bioeng. Vol. XII: 213-49 (1970).
18. Keay, L.: Microbial Proteases. Process Biochem. 6: 17 (1971).
19. Kelly, C.T.; Fogarty, W.M.: Microbial alkaline enzymes. Process Biochem. 11, 6:3-10 (1976).
20. Levisohn, S. and Aronson, A.I.: Regulation of extracellular protease production in Bacillus cereus. J. of Bacteriol.(marzo 1967) 1023-30.
21. Lodge, R.M. and Hishelwood, C.N.: The lag phase of Bacterium lactis aerogenes. J.Chem.Soc. 213-19 (1943).
22. Lovern, J.A.: Developments in the fish by products industry. J.Sci.Food Agric. 6:233 (1955).

23. Mc Bride, J.R.; Mc Hod, R.A.; Idler, D.R.: Proximate analysis of Pacific Hening (*Clupea pallasii*) and evaluation of tester's "Fat factor". *J.Fish.Res.B. Canada*, 16:679-684 (1959).
24. Meyrath, J. and Suchanek, G: Effects due to quality and quantity of inoculum. *Methods in Microbiology Vol. 7 B*. Ed. Norris 159 (1972).
25. Monsheimer, H.: Nuevos productos enzimáticos para el remojo, apelmbrado y purga dentro de los lineamientos de la racionalización de los trabajos de ribera. 2° Congreso Latinoamericano de Química y Técnicas del Cuero. Nov. 1970, Buenos Aires.
26. Makkanen, P.H.; Bailey, M.J.: Simultaneous production of -Amylase, -Glucanase and proteolytic enzymes by *Bacillus subtilis*. *J.Appl.Chem.Biotechnol.*, 24:23-103 (1974).
27. Naunsky, R.: Effects of some metals on biosynthesis of proteases in *Bacillus subtilis*. *Mikrobiologija*, 10:71-9 (1973).
28. Neumark, R.; Citri, N.: Repression of protease formation in *Bacillus cereus*. *Biochem.Biophys.Acta* 59:749-51 (1962).
29. Pardee, A.: Regulation of maximal enzyme synthesis. *Genetics of industrial microorganisms: Vol. I. Bacteria*. Eds. Vanek, Z; Hostalek, Z.; Coudlin, J. Elsevier Publishing Co. 145-53 (1973).
30. Pirt, S.J.: General nutrition (Chap. 12), *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Ed. Blackwell Scientific publications. 117-36 (1975).

31. Novo Industrials: El desarrollo de una enzima para deslanar-depilar, estable en medios altamente alcalinos. 2º Congreso Latinoamericano de Química y Técnicas del Cuero. Nov. 1970, Buenos Aires.
32. Ottesen, M.; Svendsen, I.: The Subtilisins. Methods in Enzymology. Vol. XIX, Cap. 11 (1970).
33. Reese, E.T.; Maguire, A.: Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. Appl. Microbiol. 17: 242-5 (1969).
34. Report on RNA Anual Convention. The National Provisioner 18 (Nov. 1961).
35. Segovia, R.; Daguerre, R.; Mazza, L.A.; Balatti, A.P.: Estudios sobre obtención de proteasas alcalinas. Rev. Latinoam. de Microbiol. 18:147-50 (1976).
36. Shavek, K.J. ; Schiff, T.: 47th General Meeting Int.Assoc. Dental Res. Houston Texas (1969).
37. Takeda, Y; Hizukuri: Effect of Triton X-100 on sweet potato -amylase. Biochem. et Biophys. Acta 268:175-83 (1972).
38. Zuidweg, M.; Vroemen, A.; Beubers, I: Proteolytic enzyme. Process Biochem. 4:19-21 (1969).

FE DE ERRORES

Pag.	donde dice	debe decir
9	<p>Eight Edition (1964)</p> <p>Familia: Bacillaceae Orden: Eubacteriae Clase: Esquisomicetes Especie: Bacillus subtilis Cepa: NRRL 3411</p> <p>color uniforme</p>	<p>Eight Edition (1974)</p> <p>Clase: Eschizomycetes Orden: Eubacteriales Familia: Bacillaceae Género: Bacillus Especie: subtilis Cepa: NRRL 3411</p> <p>tinción uniforme</p>
13	(Fig. 2)	(Fig. 1 y 2)
17	<p>MC 2 MC 3 MC 4 MC 7 MC 8</p>	<p>Inorp MC 2 Inorp MC 3 Inorp MC 4 Inorp MC 7 Inorp MC 8</p>
19	se suspende sobre 5 ml	se suspende en 5 ml